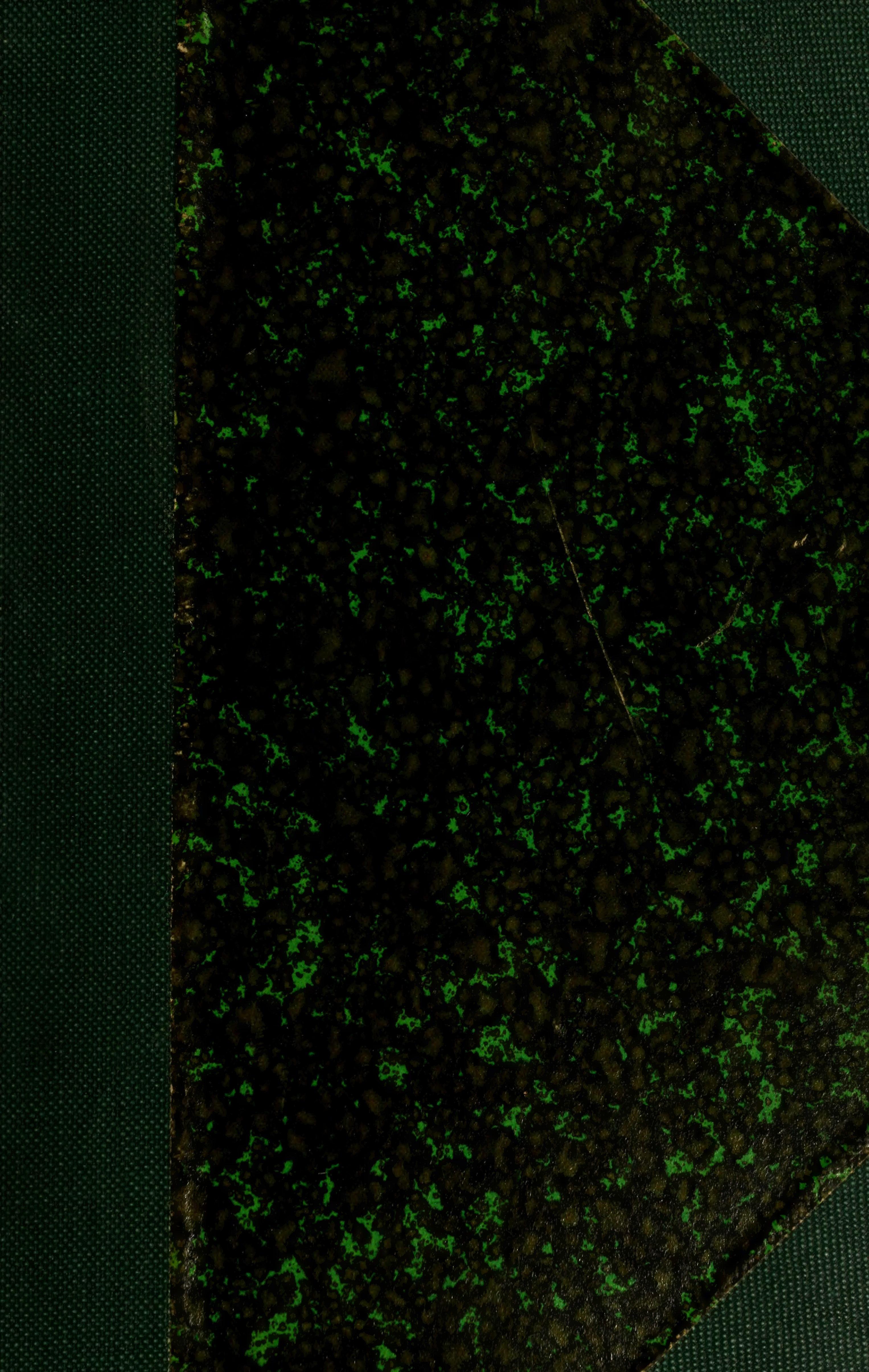


BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ACHTER BAND



BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

ACHTER BAND

BRAUNSCHWEIG

DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1906

INHALT DES ACHTEN BANDES.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

VIII. Band 1. und 2. Heft
(Ausgegeben März 1906)

Braunschweig
Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1906

Inhalt des 1. und 2. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

I.

Über einige postmortale Blutveränderungen.

Von Dr. **P. Morawitz**, Assistenzarzt.

Aus der medizin. Klinik zu Straßburg (Vorstand: Prof. Dr. v. Krehl).

---

1. Einleitung.

Es ist eine den pathologischen Anatomen schon lange bekannte Tatsache, daß das Blut in den Gefäßen der Leiche gewissen Veränderungen unterworfen ist. Bald wird es bei Autopsien zum größten Teil geronnen gefunden, bald ausschließlich oder vornehmlich in flüssigem Zustande. Wird das flüssige Blut aus den Gefäßen der Leiche entleert, so kann es noch gerinnen, wenn auch viel langsamer und unvollständiger als Blut aus den Gefäßen lebender Individuen. In den meisten Fällen haben die im Leichenblut nachträglich auftretenden Gerinnsel weder die Festigkeit noch den Umfang des normalen Blutkuchens. Es ist daher gerechtfertigt, anzunehmen, daß weniger Fibrin ausgeschieden worden ist.

Nicht selten bleiben aber auch diese spät und langsam erfolgenden Gerinnungen aus, das Leichenblut bleibt also auch außerhalb der Gefäße dauernd flüssig. Es geschieht das besonders dann, wenn zwischen dem Tode und der Sektion längere Zeit vergangen ist, obwohl, wie unten gezeigt werden wird, diese Erscheinung auch schon kurz nach dem Tode beobachtet werden kann.

Während diese Unterschiede der Gerinnbarkeit des Leichenblutes schon in der Zeit der Humoralpathologie eine gewisse Beachtung erfahren hatten, sind experimentelle Untersuchungen über diese Frage natürlich jüngeren Datums; denn erst nachdem die Haupttatsachen der Gerinnung des normalen, „lebenden“ Blutes durch die Arbeiten Alexander Schmidts festgestellt waren, konnte man mit Aussicht auf Erfolg daran gehen, auch das abweichende Verhalten des Leichenblutes zu erklären.

Alexander Schmidt[1]) hat sich nur kurz über die Ursache der langsamen Gerinnung des Leichenblutes ausgesprochen. Er nimmt an, daß in erster Reihe die Produktion des Fibrinfermentes nach dem Tode gestört ist, und äußert die Vermutung, daß langedauernder Sauerstoffmangel auf die fibrinoplastischen Substanzen ungünstig wirkt.

Schon früher hatte Virchow[2]) darauf aufmerksam gemacht, daß das Kapillarblut der Leichen die Fähigkeit zu gerinnen häufig verloren hat, während Herz und große Gefäße mit Gerinnseln angefüllt sind. Auf Virchows Veranlassung ist Falk[3]) der Frage nach den Ursachen dieser Erscheinung näher getreten. Er fand bei Untersuchung von Kapillarblut der Leiche mit den damals üblichen Methoden Alexander Schmidts, daß die Ungerinnbarkeit vor allem auf einem Fehlen von fibrinogener Substanz beruht und eine Abschwächung der fibrinoplastischen Energie erst in zweiter Linie in Betracht kommt. Falk nimmt an, daß das Fibrinogen post mortem durch die Gefäßwände in die Gewebe diffundiert und vielleicht zur Entstehung der Totenstarre in gewisser Beziehung steht. Diese Annahme erscheint nicht gerade sehr wahrscheinlich, wenn man sich daran erinnert, daß das Fibrinogen der am schlechtesten diffundierende Eiweißkörper des Blutplasmas ist, und Totenstarre auch beim entbluteten und ausgewaschenen Tier beobachtet wird. Später hat Falk[4]) seine Annahme auch dahin modifiziert, daß bald nach dem Tode durch Fäulnis eine Auflösung der Fibringerinnsel eintritt, wobei das Fibrin in globulinähnliche Substanzen übergeht.

In neuerer Zeit ist besonders von den Vertretern der gerichtlichen Medizin die Aufmerksamkeit auf das Verhalten des Leichenblutes gelenkt worden. Man hoffte nämlich auf Grund der Gerinnbarkeit Schlüsse auf die Todesart ziehen zu können. Besonders ist hier die Arbeit von Corin[5]) zu erwähnen, die sich mit dem Flüssigbleiben des Blutes bei Erstickung beschäftigt. Corin findet im flüssigen Leichenblut immer Fibrinogen, dagegen sehr wenig Fibrinferment. Demgemäß sucht er die Ursache für das Flüssigbleiben des Blutes darin, daß im Organismus nach dem Tode keine neue Fermentbildung zustande kommt und die Größe der Leichengerinnsel von dem vitalen Fermentgehalt abhängig ist. Außerdem soll die Bildung einer gerinnungshemmenden Substanz von Seiten der Gefäßwände eine wichtige Rolle spielen.

Wie sich später zeigen wird, entsprechen meine Resultate vielmehr denen von Falk als denen von Corin. Worauf diese

Differenz beruht, kann ich leider nicht sicher angeben und möchte daher eine Diskussion vermeiden. Nur so viel sei hier bemerkt, daß sich Corin zum Nachweis des Fibrinogens meist der fraktionierten Koagulation bediente, einer Methode, die wohl kaum so zuverlässige Resultate gibt wie die Salzfällung.

Aus jüngster Zeit liegt eine Arbeit von Wachholz und Horoskiewicz[6]) vor, die mir leider nur im Referat zugänglich war. Diese Autoren finden, daß Herzblut Ertrunkener im allgemeinen in den Gefäßen flüssig bleibt, bei Berührung mit Fremdkörpern aber noch gerinnen kann, wenn seit dem Tode nicht mehr als 24 bis 48 Stunden verflossen sind. Im anderen Falle bleibt es auch bei Berührung mit Fremdkörpern flüssig. Über die Ursache dieser Erscheinung sprechen sich Wachholz und Horoskiewicz nicht bindend aus, meinen aber, daß man keine Anhaltspunkte für eine postmortal eintretende Dekoagulation, d. h. eine Wiederauflösung schon gebildeten Fibrins beibringen kann.

Da einmal die Ansichten über die Ursachen der Ungerinnbarkeit des Leichenblutes sehr einer Revision zu bedürfen schienen, da sich ferner die Anschauungen über den Gerinnungsvorgang in letzter Zeit auf Grund der Arbeiten von Fuld[7]), Fuld und Spiro[8]) und vom Verfasser[9]) etwas verschoben haben, schien eine Neubearbeitung der Frage wünschenswert. Ich sah meine Aufgabe nicht darin, festzustellen, bei welchen Krankheitszuständen das Blut innerhalb der Leiche fest wird oder flüssig bleibt — dazu ist die Anzahl meiner Beobachtungen viel zu gering — sondern es sollte der Versuch gemacht werden, auf Grund der modernen Anschauungen über die Blutgerinnung die Ursachen der Gerinnungshemmung in den einzelnen Fällen klarzulegen.

Es ist hier nicht der Ort, ausführlicher auf die Lehre von der Blutgerinnung einzugehen. Nur so viel mag hervorgehoben werden, daß die Gerinnung in zwei Hauptphasen zerfällt: erstens die Bildung des Fibrinfermentes und zweitens die fermentative Überführung des gelösten Fibrinogens in das unlösliche Fibrin. Man weiß jetzt, daß zur Entstehung des Fermentes zwei fermentartige Körper zusammenwirken müssen, von denen der eine, das Thrombogen, wahrscheinlich sich im Plasma gelöst findet, während der andere, die Thrombokinase, sicher erst extravaskulär von geformten Elementen abgegeben wird. Die Rolle der Kalksalze mag hier unerörtert bleiben, da sie für die vorliegende Frage ohne Bedeutung ist.

Nach dem Gesagten ist es klar, daß die nächsten Ursachen der mangelhaften oder völlig fehlenden Gerinnung des Leichen-

blutes sehr verschieden sein können. Außer dem Fehlen des Fibrinogens können auch Veränderungen der Fermentvorstufen oder des Fermentes selbst eine Rolle spielen.

Damit sind aber die Möglichkeiten noch nicht erschöpft; denn seit den Untersuchungen von Bordet und Gengou[10]) weiß man, daß trotz Anwesenheit aller für die Gerinnung notwendigen Faktoren im Plasma doch keine Fermentbildung stattfindet, wenn der Kontakt mit einem benetzbaren Fremdkörper fehlt. Diese Erfahrungen sind an Plasma gewonnen worden, das in paraffinierten Gefäßen aufgefangen war. Die tote Gefäßwand verhält sich nun allerdings, wie aus zahlreichen Beobachtungen, besonders auch aus den interessanten Versuchen von Brücke[11]), von Baumgarten[12]) u. a. hervorgeht, im Gegensatz zur lebenden Gefäßwand offenbar wie ein Fremdkörper.

Es liegt aber gewiß die Möglichkeit vor, daß im Blute, bevor die Gefäßwand vollständig abgestorben und zu einem Fremdkörper geworden ist, Veränderungen vor sich gehen können, die eine Gerinnung unmöglich machen.

Corin[5]) hebt bereits hervor, daß auch die Wirkung gerinnungshemmender Körper, die post mortem entstehen könnten, berücksichtigt werden muß. Gerade in neuerer Zeit ist von verschiedenen Seiten die Anwesenheit von Antithrombinen im Blute beobachtet worden.

Daneben kommen vielleicht noch einige andere Punkte in Betracht. So muß man z. B. an Gerinnungshemmung durch Säurebildung im Leichenblut denken.

Wie man sieht, sind, soweit man a priori urteilen kann, sehr viele Möglichkeiten gegeben, die zu einer Erklärung der mangelhaften Gerinnung des Leichenblutes beitragen könnten. Es erschien mir daher zweckmäßig, meine Untersuchungen nach einem gewissen Schema anzustellen, wobei Fehler am ehesten vermieden und alle Möglichkeiten berücksichtigt werden konnten.

2. Methodisches.

Das untersuchte Leichenblut wurde bei Sektionen im hiesigen pathologischen Institut gewonnen, meist 12 bis 24 Stunden post mortem. Einzelheiten werden, soweit erforderlich, in den Versuchsprotokollen mitgeteilt werden.

Das Blut wurde aus dem Herzen und den großen Gefäßen geschöpft, möglichst unter Vermeidung einer Berührung mit den Geweben; dabei wurde auf das Vorhandensein von Gerinnseln in den Gefäßen geachtet.

Das Leichenblut wurde möglichst schnell zentrifugiert, wobei besonders die Aufmerksamkeit auf nachträgliches Auftreten von Fibringerinnseln gerichtet wurde.

In dem durch Abschleudern erhaltenen Leichenblutplasma bzw. -Serum geschah der Nachweis des Fibrinogens nach der von Spiro und Porges[13]) ausgearbeiteten Methode mittels Natriumsulfat. In gewissen Fällen wurde nach derselben Methode die Trennung der Albumin- und Globulinfraktion durchgeführt und der inkoagulable Stickstoff bestimmt.

Zur Kontrolle der Salzfällungsmethode bzw. des Nachweises von Fibrinogen wurde in jedem Falle das Leichenblut auch mit großen Mengen stark wirksamen Fibrinfermentes versetzt. Fermentativ stark wirksame Lösungen erhält man, wie früher dargelegt wurde[14]), durch Aktivieren von Pferdeserum mit der gleichen Menge $^1/_{10}$ n-NaOH und Rücktitration nach $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde.

Als Indikator für fertiges Fibrinferment diente eine nach Hammarsten[15]) aus Oxalatplasma vom Pferde hergestellte Fibrinogenlösung, die, wenn man von den schwer zu gewinnenden „proplastischen Flüssigkeiten“ Schmidts (Pericardialflüssigkeit vom Pferde usw.) absieht, als einziger einwandfreier Indikator für Fibrinferment in Betracht kommt.

Leicht gelingt der Nachweis der im Serum gelösten Vorstufe des Fibrinfermentes, des Thrombogens. Fügt man nämlich zu dem Serum erst einige Tropfen eines Gewebsauszuges, der sehr reich an Thrombokinase ist, und dann Fibrinogenlösung, so wird, falls noch Thrombogen vorhanden ist, durch Aktivierung und Bildung von fertigem Thrombin eine starke Beschleunigung der Gerinnung eintreten, wie in früheren Arbeiten auseinandergesetzt worden ist[9]). (Hier benutzte ich stets einen Kochsalzextrakt aus Menschenlebern, um etwaigen Schwierigkeiten zu begegnen, die bei Benutzung tierischer Organe durch die Spezifizität der Thrombokinasen erwachsen könnten[16]) [17]).

Schwierig und unsicher ist der Nachweis der Thrombokinase in fermenthaltigem Serum. Es bedarf dazu einer komplizierten Versuchsanordnung, die hier nicht in Betracht kommt, da nicht die quantitativen Verhältnisse, sondern nur das Fehlen der Thrombokinase von Interesse ist. Durch Zusatz von Gewebssaft zu ungerinnbarem Leichenblut kann das Fehlen der Thrombokinase leicht nachgewiesen werden.

In gewissen Fällen war es auch von Interesse, das Leichenblut auf die inaktive Stufe des Fibrinfermentes, das Metathrombin, zu untersuchen. Es geschah das nach der oben geschilderten Methode der Alkaliaktivierung.

Zur Untersuchung auf gerinnungshemmende Körper mußte in den meisten Fällen eine Kombination des Leichenserums mit sehr wirksamem Fibrinferment zur Verwendung kommen, da das Leichenserum selbst fast immer etwas Fibrinferment enthielt und ein Antithrombin dadurch hätte verdeckt werden können. In einigen Fällen wurde auch der Einfluß von Leichenblut auf den Vorgang der Aktivierung von Normalserum durch Gewebssaft untersucht.

Es sei hier gleich vorweggenommen, daß niemals die Anwesenheit größerer Mengen gerinnungshemmender Körper im Leichenblut erwiesen werden konnte. Das Leichenserum verhielt sich in diesem Punkte durchaus wie Normalserum.

3. Die Fibrinolyse im Leichenblut.

Bei der Mehrzahl der 17 von mir untersuchten Leichen fanden sich, wie ja nicht anders zu erwarten war, im Herzen und den großen Gefäßen Gerinnsel, die bald die Gefäße fast völlig füllten, bald wieder nur sehr klein und unbedeutend waren. Neben den Gerinnseln wurde jedoch stets auch flüssiges Blut in größerer oder geringerer Menge angetroffen. Mehrfach konnten in diesem flüssigen Blute nachträglich eintretende Gerinnungen beobachtet werden, die, wie es ja schon bekannt war, meist nur zur Bildung wenig umfangreicher Fibringerinnsel führten. Auf die Ursachen des Eintretens dieser Nachgerinnungen wird später bei Besprechung der fermentativen Eigenschaften des Leichenblutes eingegangen werden. In den meisten Fällen wurden aber diese Nachgerinnungen vermißt, das Blut blieb dauernd flüssig.

Es liegt nun gewiß am nächsten, anzunehmen, daß das flüssige ungerinnbare Blut nichts anderes ist als Serum, das von den in der Leiche zurückgebliebenen Fibringerinnseln abgepreßt worden ist. Dem widerspricht aber eine ganze Reihe von Beobachtungen. In erster Linie sind die Fibringerinnsel, die in der Leiche angetroffen werden, häufig viel zu klein, als daß man annehmen dürfte, daß in ihnen der gesamte Fibringehalt des Blutes enthalten sei. Wichtiger noch ist die Beobachtung, daß das ungerinnbare Leichenblut eine große Menge roter Blutkörperchen enthält, wovon man sich leicht beim Zentrifugieren überzeugen kann. Stets entspricht das Volumen der Blutkörperchen ungefähr der Hälfte des Gesamtvolumens der Flüssigkeit, was natürlich nicht möglich wäre, wenn es sich einfach um Abpressung von Serum handeln würde, und die Bedingungen dabei dieselben wären wie bei der Retraktion des Blutkuchens in vitro.

Ein sicherer Beweis dafür, daß das ungerinnbare Leichenblut nicht oder doch nur selten dem Blutserum gleichzusetzen ist, ergibt sich aus Beobachtungen an fünf Leichen, bei denen keine Spur von Gerinnseln gefunden wurde, das Blut aber trotzdem dauernd flüssig blieb.

Da das flüssige Leichenblut also durchaus nicht dem entspricht, was man als Serum bezeichnet, und in gewissen Fällen eine Gerinnung überhaupt nicht stattgefunden zu haben scheint, ist die Untersuchung auf Fibrinogen von gewissem Interesse.

Es findet sich dabei die merkwürdige Tatsache, daß das Leichenblut, selbst in den Fällen, in denen scheinbar keine Gerin-

nung vorhergegangen war, auch durch die stärksten Fermentlösungen nicht zum Gerinnen gebracht werden kann und, wie die Prüfung mit der Salzfällungsmethode ergibt, keine Spur von Fibrinogen mehr enthält. (Auf einige Fälle, die sich anders verhalten, wird später eingegangen werden.)

Natürlich erhebt sich sofort die Frage, wo das Fibrinogen geblieben ist. Diese Frage kann durch drei meiner Beobachtungen mit Sicherheit dahin entschieden werden, daß in der Leiche nicht selten schon in kurzer Zeit eine Fibrinogenolyse oder Fibrinolyse eintritt, die langsamer oder schneller das Fibrinogen bzw. das Fibrin in chemisch sich anders verhaltende Körper überführt. Von welchen Bedingungen die Intensität dieses Vorganges abhängig ist, läßt sich bei der geringen Anzahl meiner Beobachtungen nicht sicher sagen. Auffallend ist immerhin, daß in den drei Fällen, in denen die stärkste Fibrinolyse beobachtet wurde, der Tod relativ schnell eingetreten war. Ganz fehlen dürfte die Fibrinolyse nicht häufig.

Im folgenden mag eine der am meisten überzeugenden Beobachtungen kurz mitgeteilt werden.

20jähriger Mann. Plötzlicher Tod infolge von Hydrocephalus internus chronicus. Autopsie zehn Stunden post mortem. Das Blut im Herzen und den großen Gefäßen ist völlig flüssig. Beim Stehen in vitro bilden sich langsam einige feine, kleine Gerinnsel, die während des Zentrifugierens verschwinden. Das Plasma ist ziemlich stark rot gefärbt. Es gerinnt weder spontan, noch bei Zusatz stärksten Fibrinfermentes und enthält kein Fibrinogen.

Setzt man 1 ccm von diesem Plasma zu 5 ccm Fibrinogenlösung, so tritt keine Gerinnung ein. Versetzt man dieses Gemisch, nachdem es etwa 1 bis 2 Stunden im Brutschrank gestanden hat, mit Fibrinferment, so bleibt es ebenfalls dauernd flüssig, während eine zur Kontrolle angesetzte Mischung von Fibrinferment und Fibrinogenlösung in 5 bis 10 Minuten fest wird.

Das heißt also, daß das Leichenplasma, welches, wie früher schon erwähnt wurde, nicht etwa einen gerinnungshemmenden Körper enthält, in der Zeit von 1 bis 2 Stunden das zugesetzte Fibrinogen so weit verändert hat, daß es nun nicht mehr in Fibrin übergeführt werden kann.

Während es sich bei dieser Versuchsanordnung also um eine Fibrinogenolyse handelt, d. h. um eine Zerstörung der Muttersubstanz des Fibrins, läßt sich leicht zeigen, daß auch die Auflösung schon ausgeschiedenen Fibrins ebenso rasch verläuft.

Versetzt man nämlich 5 ccm der Fibrinogenlösung zu gleicher Zeit mit einigen Tropfen stark wirksamen Fibrinfermentes und 1 ccm des Leichenplasmas, so tritt in einigen Minuten Gerinnung

ein. Das Gerinnsel beginnt sich aber alsbald zusammenzuziehen und ist in kurzer Zeit (etwa 1 Stunde) völlig verschwunden.

Es würde zu weit führen, die zahlreichen anderen Beobachtungen, unter denen zwei die gleiche Intensität der Erscheinungen aufwiesen, hier in extenso aufzuführen.

Es mag genügen, summarisch zu sagen, daß neben diesen drei Fällen noch einige andere Fibrinolyse zeigten, die allerdings nicht so stark war.

Mehrfach wurde dagegen die Fibrinolyse völlig vermißt, und zwar auffallenderweise gerade im Blute zweier Leichen, bei denen keine Gerinnsel in den Gefäßen und auch kein Fibrinogen im flüssigen Blute gefunden werden konnte. Es kann also wohl kaum zweifelhaft sein, daß auch hier Fibrinolyse oder Fibrinogenolyse vorhergegangen war. Aus welchen Gründen sie sich im Reagenzglase nicht mehr nachweisen ließ, muß man offen lassen.

Nach den hier mitgeteilten Erfahrungen darf man mit Sicherheit annehmen, daß in vielen Fällen die Ungerinnbarkeit des Leichenblutes darauf beruht, daß es kein Fibrinogen mehr enthält. Man braucht dabei nicht daran zu denken, daß das Blut immer geronnen war, und die Gerinnsel sich dann wieder auflösten; jedenfalls legen die hier mitgeteilten Erfahrungen die Vermutung nahe, daß schon, ehe Gerinnung eintritt, das gelöste Fibrinogen verändert werden kann. Nicht überall, wo flüssiges, fibrinogenfreies Blut angetroffen wird, ist also eine „Dekoagulation" anzunehmen.

Die Fibrinolyse ist ein schon lange bekannter Vorgang, der mannigfache Erklärungen gefunden hat, auf die ich hier nicht eingehen möchte. Ich verweise auf die von mir gegebene Darstellung des Gegenstandes in Asher-Spiros Ergebnissen [18]). So viel kann wohl jetzt, besonders auf Grund der Arbeiten von Dastre [19]), als sicher angesehen werden, daß es sich dabei um einen fermentativen Vorgang handelt, bei dem bakterielle Einflüsse keine Rolle zu spielen brauchen. Auch ich habe mich gelegentlich früherer Beobachtungen in diesem Sinne ausgesprochen [14]). Ob die Fibrinogenolyse auch auf die Tätigkeit des fibrinolytischen Fermentes zurückzuführen ist, läßt sich vorerst noch nicht sicher entscheiden, ist aber wahrscheinlich.

In den hier aufgeführten Fällen glaube ich bakterielle Einwirkungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen zu dürfen, da die intensivste Fibrinolyse gerade dort zu beobachten war, wo die Autopsie schon wenige Stunden nach dem Tode stattfand. In

anderen Fällen, die 24 bis 48 Stunden post mortem obduziert wurden, war eine Fibrinolyse häufig gar nicht oder nur andeutungsweise nachweisbar.

Es erhebt sich jetzt natürlich die Frage, woher das fibrinolytische Ferment stammt und warum es erst nach dem Tode seine Wirksamkeit entfaltet.

Eine vollständig bindende Antwort auf diese Frage wird man vorerst wohl kaum geben können. Am meisten Wahrscheinlichkeit hat die Ansicht für sich, daß nach dem Tode gewisse hemmende Einwirkungen fortfallen und das fibrinolytische Ferment nun ungehindert seine Tätigkeit entfalten kann. Dafür sprechen einige Beobachtungen, die mir darauf hinzudeuten scheinen, daß normales Serum die fibrinolytische Wirkung von Leichenplasma zu hemmen imstande ist. Auch die große Ähnlichkeit, die fibrinolytisches Leichenblut mit dem Blute bei der experimentellen Phosphorvergiftung zeigt, würde in diesem Sinne zu verwerten sein, da nach den Untersuchungen von Jakoby[20]) u. a. auch dort ein Fortfall fermenthemmender Körper angenommen werden muß.

Ein Punkt bedarf noch vielleicht der Erörterung. In einer früheren Versuchsreihe[14]) hatte ich das Auftreten einer starken Fibrinolyse im hämolytischen Oxalatplasma des Pferdes beobachtet und die Vermutung ausgesprochen, daß die Hämolyse für das Auftreten der Fibrinolyse von Bedeutung sein kann. Nun ist auch das Leichenplasma fast immer stark hämolytisch, und es ist jedenfalls die Möglichkeit gegeben, daß auch diese Erscheinung für das Zustandekommen der Fibrinolyse von Wichtigkeit ist. Doch ist zu bemerken, daß im Leichenplasma Hämolyse und Fibrinolyse keineswegs parallel gehen.

Ein gewisses allgemeineres Interesse gewinnen diese Versuche über Fibrinolyse im Leichenblut deshalb, weil sie darauf hindeuten, wie fein die Vorrichtungen sind, mit denen der lebende Organismus die autolytischen Vorgänge reguliert; erst nach dem Tode versagen die hemmenden Kräfte, und eine ungemein intensive Autolyse kann Platz greifen.

Über die Art des Abbaues des Fibrinogens und Fibrins kann ich keine neuen Tatsachen mitteilen. In dem stark fibrinolytischen Leichenplasma hielten sich die Albumin- und Globulinfraktion etwa in den Grenzen der Norm. Eine Vermehrung des inkoagulablen Stickstoffs trat nicht deutlich hervor. Daher kann von einer Wiedergabe der Zahlen abgesehen werden.

4. Das Fibrinferment im Leichenblut.

In den meisten Fällen ist also die Ungerinnbarkeit des Leichenblutes in seinem Mangel an Fibrinogen begründet. Jedoch findet

man auch, wie früher schon angedeutet wurde, Blut, das zwar innerhalb der Gefäße flüssig geblieben ist, in vitro aber schneller oder langsamer Gerinnsel bildet, also doch noch Fibrinogen enthält. Man wird nicht fehlgehen, wenn man annimmt, daß in diesen Fällen innerhalb der Gefäße der Leiche keine hinreichende Bildung von Fibrinferment zustande kommt, sondern erst extravasculär erfolgt. Es erhebt sich dann nun sofort die Frage, welcher der zur Fermentbildung nötigen Körper innerhalb der Gefäße nicht in genügender Weise produziert wurde, und warum die Gerinnungen des Leichenblutes in vitro so ungemein langsam verlaufen.

Zur Entscheidung dieser Fragen ist es zunächst notwendig, festzustellen, ob das flüssige, fibrinogenfreie Leichenplasma überhaupt in der Regel fermenthaltig ist. Daß eine Fermentbildung stattgefunden hat, ergibt sich unmittelbar aus dem Vorhandensein der Leichengerinnsel. Es zeigt sich nun auch, daß Leichenblut meist Fibrinferment enthält und daß sich auch die Vorstufe desselben, das Thrombogen, in der oben beschriebenen Weise nachweisen läßt. Jedoch ist der Gehalt des Leichenblutes an diesen Substanzen meist auffallend gering und jedenfalls stets kleiner als der des Normalserums. Dabei läßt sich kein Hinweis darauf finden, daß die Länge der Zeit, die seit dem Tode verstrichen war, von Bedeutung für die Abschwächung der fermentativen Wirkung ist. Dagegen findet man, daß in stark fibrinolytisch wirksamem Leichenblut das Fibrinferment und das Thrombogen sich nur in sehr geringer Menge nachweisen lassen oder, wie mehrfach beobachtet werden konnte, ganz verschwunden sind.

Man darf daher wohl annehmen, daß durch das fibrinolytische Ferment oder durch andere, zusammen mit der Fibrinolyse verlaufende Vorgänge das Ferment und die eine seiner Vorstufen vernichtet werden. Es hat das deswegen ein gewisses Interesse, weil sich dadurch die früher erwähnte Analogie zwischen dem Leichenblut und dem Blute bei experimenteller Phosphorvergiftung noch weiter vervollständigt; denn, wie man schon seit den Untersuchungen von Corin und Ansiaux[21]) weiß, verschwindet bei der Phosphorvergiftung zugleich mit dem Fibrinogen auch der jetzt als Thrombogen (Prothrombin) benannte Körper, während die Thrombokinase erhalten bleibt. Auch von dieser letzteren Tatsache konnte ich mich zweimal am Leichenblut überzeugen: Zusatz des fermentativ ganz unwirksamen Leichenplasmas, dem auch das Thrombogen fehlte, beschleunigte ganz erheblich die Gerinnung

von Fibrinogenlösung durch Normalserum, was jedenfalls mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein von Thrombokinase im Leichenblut hinweist.

Es ist also nach dem Gesagten mindestens sehr wahrscheinlich, daß die Schwäche der fermentativen Eigenschaften des Leichenblutes zum Teil mit den Erscheinungen der Fibrinolyse zusammenhängt.

Da das Leichenblut also meistens Fibrinferment enthält, so stößt die Erklärung der erst in vitro auftretenden Gerinnungen auf gewisse Schwierigkeiten; denn es ist klar, daß, wenn die Entstehung des Fibrinfermentes in der Leiche in normaler Weise verliefe und nur später durch die Fibrinolyse beeinflußt würde, keine Nachgerinnungen auftreten dürften.

Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich aus einigen Beobachtungen, die im folgenden kurz besprochen werden mögen. Es läßt sich nämlich zeigen, daß die Entstehung des Fibrinfermentes in den Gefäßen der Leiche mindestens nicht immer in normaler Weise verläuft, weil sich offenbar im Leichenblut nach ziemlich kurzer Zeit bereits Veränderungen einstellen, welche die Abgabe von Thrombokinase seitens der geformten Elemente schädigen.

Eine der Beobachtungen soll im folgenden mitgeteilt werden:

39jähriger Mann, unter starker Kachexie an Darmcarcinom gestorben. Sektion zehn Stunden post mortem. Das Blut ist ganz flüssig. In vitro tritt in einer halben Stunde ein feines Gerinnsel auf, ebenso sieht man im klaren, nicht hämolytischen Plasma nach dem Zentrifugieren ein feines Fibrinnetz.

Das von dem Fibrinnetz befreite Plasma enthält noch reichliche Mengen von Fibrinogen. Spontan gerinnt es ganz langsam und schußweise. Die spontane Gerinnung ist erst nach 6 bis 7 Stunden bei Zimmertemperatur trotz häufigen Umfüllens beendet. Dagegen wird das Plasma auf Zusatz von ein wenig Gewebssaft in 1 bis 2 Minuten fest.

Es geht also hieraus hervor, daß die mangelhafte Gerinnbarkeit dieses Blutes eine ganz andere Ursache hat als bei den bisher besprochenen Fällen. Dieses Blut gerinnt deshalb so äußerst langsam, weil es an Thrombokinase arm ist. Es läßt sich nicht mit dem Blute bei der experimentellen Phosphorvergiftung vergleichen, sondern erinnert in seinen Eigenschaften vielmehr etwa an das in paraffinierten Röhrchen gewonnene oder an nicht ganz sauber hergestelltes Gansplasma.

Die Gerinnung des Leichenblutes in diesem Falle zeigt ferner manche Ähnlichkeit mit der Gerinnung der Lymphe. In der Tat

ist auch, wie mich ein Versuch belehrte, die Ursache der langsamen Gerinnung in beiden Fällen die gleiche: es ist der Mangel bzw. die langsame Entstehung der Thrombokinase. Thrombogen war sowohl in der Lymphe als in dem besprochenen Leichenblut in nicht geringerer Menge vorhanden als in einem Normalserum.

Ähnliche Beobachtungen konnten noch zweimal an Hunden und Kaninchen gemacht werden, die zufällig verendet waren und etwa 12 bis 24 Stunden post mortem obduziert wurden. Jedoch war hier die spontane Gerinnung im extravasculären Blute schon in etwa $^1/_2$ Stunde vollendet, wurde aber durch Gewebssaft erheblich beschleunigt.

Wenn es hiernach nicht zweifelhaft sein kann, daß die Bildung der Thrombokinase im Leichenblut weder so schnell und explosionsartig verläuft wie im normalen extravasculären Blute, noch ihr quantitativ gleichkommt, so ist es doch nicht ganz leicht, sich eine Vorstellung von den Ursachen dieser Erscheinung zu machen.

Es sind mehrere Möglichkeiten der Erklärung gegeben, deren Erörterung hier zu weit führen würde. Am wahrscheinlichsten ist es, daß die Blutplättchen und Leukocyten, die wohl mit Sicherheit normalerweise bei Kontakt mit Fremdkörpern die Thrombokinase abgeben, im Leichenblut allmählich gewissen Veränderungen unterworfen sind. Verlaufen diese Veränderungen schneller als die Absterbeerscheinungen der Gefäßwand, so kann es geschehen, daß die Fähigkeit der geformten Elemente, Thrombokinase in das Plasma abzugeben, schon stark geschädigt ist, wenn Fremdkörper, also etwa die tote Gefäßwand, mit dem Blute in Berührung kommt. Nun dürfte der durch die tote Gefäßwand gesetzte Reiz nur recht geringfügig sein, weswegen die Fermentbildung in Glasgefäßen usw. wohl schneller verläuft als in den Gefäßen der Leiche, aber doch noch immer viel langsamer als in der Norm.

Durch das gelegentliche Hinzutreten der Fibrinolyse würden sich alle am Leichenblut beobachteten Erscheinungen, nämlich das häufige Fehlen des Fibrinogens, die Fermentarmut und die Langsamkeit der Nachgerinnungen ungezwungen erklären.

Die Resultate meiner Untersuchungen stimmen also insofern mit den Angaben von Corin[5]) überein, als auch ich eine nur sehr geringe Fermenterzeugung post mortem annehme. Niemals habe ich aber in einem Leichenblut, das vollkommen ungerinnbar war, Fibrinogen finden können.

Über das Metathrombin, die durch Alkali aktivierbare unwirksame Modifikation des Fibrinfermentes, mag nur so viel gesagt werden, daß es sich in den meisten Fällen im Leichenblut nicht nachweisen ließ. Das ist nicht weiter überraschend, wenn man

sich daran erinnert, daß das Metathrombin wahrscheinlich aus dem Fibrinferment kurz nach der Gerinnung hervorgeht und die Fermentbildung im Leichenblut, wie gezeigt wurde, ziemlich geringfügig ist.

5. Zusammenfassung.

1. Die Ungerinnbarkeit des Leichenblutes beruht fast immer auf dem Fehlen des Fibrinogens.

2. Das Verschwinden des Fibrinogens kommt durch Fibrinolyse zustande, die individuell sehr verschieden intensiv und zuweilen so stark ist, daß schon zehn Stunden post mortem das gesamte Fibrin und Fibrinogen verschwunden sein kann.

3. Auch eine Zerstörung des Fibrinogens vor eingetretener Gerinnung kann beobachtet werden.

4. Die übrigen Eiweißkörper des Blutplasmas werden durch das fibrinolytische Ferment scheinbar nicht angegriffen.

5. In vielen Fällen ähnelt das Leichenblut durchaus dem Blute bei der experimentellen Phosphorvergiftung.

6. Enthält das Leichenblut noch Fibrinogen, so gerinnt es langsam. Die Langsamkeit der Gerinnung beruht auf einem Mangel an Thrombokinase.

7. Meist enthält Leichenblut Fibrinferment nur in geringer Menge.

8. Für das Auftreten gerinnungshemmender Körper im Leichenblut liegen keine Anhaltspunkte vor.

Herren Prof. von Recklinghausen und Prof. Dr. Schmidt spreche ich für die freundliche Überlassung des Materials meinen besten Dank aus.

Literatur.

[1]) Alexander Schmidt: Pflügers Arch. 6, 450.
[2]) Virchow: Gesammelte Abhandl., S. 113.
[3]) Falk: Virchows Arch. 59, 26.
[4]) Derselbe: Vierteljahrsschr. f. ger. Med. N. F. 52, 215. Zit. n. Corin.
[5]) Corin: Vierteljahrsschr. f. ger. Med. [3] 5 (1893).
[6]) Wachholz u. Horoskiewicz: Przeglad lekarski 1904, No. 26. (Polnisch.) Zit. n. Folia haematologica 2.
[7]) Fuld: Zentralbl. f. Physiol. 17, H. 19.
[8]) Fuld u. Spiro: Diese Beiträge 5, 171.
[9]) Morawitz: Deutsch. Arch. f. klin. Med. 79.
[10]) Bordet u. Gengou: Annal. de l'Instit. Pasteur 17, 822.
[11]) Brücke: Virchows Arch. 12, 81.
[12]) v. Baumgarten: Med. Zentralbl. 1876, Nr. 34.

[13]) Spiro u. Porges: Diese Beiträge 3, 277.
[14]) Morawitz: Diese Beiträge 4, 381.
[15]) Hammarsten: Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 333.
[16]) Muraschew: Deutsch. Arch. f. klin. Med. 80, 187.
[17]) Loeb: The Medical News, New York, 1. Aug. 1903.
[18]) Morawitz: Die Chemie der Blutgerinnung. Ergebnisse der Physiologie 4, 307.
[19]) Dastre: Arch. de physiol. [5] VII, 2, 408.
[20]) Jakoby: Zeitschr. f. physiol. Chem. 30.
[21]) Corin u. Ansiaux: Vierteljahrsschr. f. ger. Med. 3, 434.

II.

Beeinflussung und Natur des Labungsvorganges.

Von **H. Reichel** und **K. Spiro.**

Zweite Mitteilung.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Während wir in der vorhergehenden Mitteilung versucht haben, die Abhängigkeit des Labungsvorganges von verschiedenen Bedingungen festzustellen, beabsichtigten wir durch die im folgenden dargelegten Untersuchungen uns einen Einblick in das Wesen des Prozesses und seiner Gesetze zu ermöglichen.

Übereinstimmend wird von den verschiedensten Autoren angenommen, daß die Labung zwei verschiedene Vorgänge in sich faßt: daß vorerst das Kaseïn in einen anderen, sehr ähnlichen Körper, das Parakaseïn, umgewandelt wird, der zunächst in kolloidaler Lösung bleibt, aber dann durch den zweiten Vorgang, die Parakaseïnkalkbildung, plötzlich ausgefällt wird. Was man allein sicher beobachten kann, ist die Dauer des ganzen Labungsvorganges; der Anteil der beiden Teilprozesse daran ist noch nicht genügend untersucht worden.

Auf zwei Wegen schien es möglich, hierüber etwas zu erfahren: zunächst bei der physikalischen Natur des Ausfällungsvorganges durch Beobachtung der physikalischen Zustandsänderungen der Milch während der Labung, dann aber auch dadurch, daß versucht wurde, durch äußere Eingriffe die beiden Vorgänge voneinander zu trennen.

1.

Bisher ist bekannt, daß der Labungsvorgang mit positiver Wärmetönung einhergeht und daß dabei der Gefrierpunkt sich nicht ändert. Wir konnten auch für die elektrische Leitfähigkeit

feststellen, daß im Moment der Fällung zwar Schwankungen am Telephon, offenbar infolge mechanischer Ursachen hörbar sind, eine Änderung des absoluten Betrages aber nach derselben nicht wahrzunehmen ist. Da die beiden letztgenannten Methoden nur über eine Summe von verschiedenen Vorgängen berichten, so ist trotzdem eine entgegengesetzt gerichtete Verschiebung einzelner solcher möglich, ja sogar wahrscheinlich, da nach Titrationsversuchen im Filtrat der Ammonsulfatfällung bei der nativen Milch mehr neutralisierbare OH'-Ionen nachweisbar sind als bei der gelabten.

Von derselben Milch werden zwei Proben zu je 10 ccm entnommen, die eine mit nativer, die andere mit gekochter Lablösung, und jede von beiden nach einiger Zeit mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. 50 ccm des Filtrats der gelabten Milch verlangen zur Neutralisation 0,9, die der unveränderten 1,5 ccm $^1/_{10}$n-Säure (Indikator Cochenille).

2.

Eine zeitliche Verfolgung der Viskosität während der Labungsdauer ergab übereinstimmend in 12 Versuchen, von denen 6 im Protokoll I, 1 bis 6, wiedergegeben sind, daß zunächst die innere Reibung nicht zunimmt, ungefähr nach der Hälfte der gesamten Gerinnungszeit aber deutlich und immer rascher bis zur Fällungszeit ansteigt. Der Anstieg erscheint durchaus gesetzmäßig, ohne daß er sich durch eine einfache Formel ausdrücken ließe.

Es wurde ferner das Verhalten der inneren Reibung bei Gegenwart von kalkbindenden Stoffen untersucht, welche, wie bekannt, die Ausfällung hemmen, ohne daß sie nach der allgemeinen Annahme die eigentliche Labung hindern, da ja ein entsprechender Kalkzusatz nach der Labung sofortige Ausfällung hervorruft. Die Protokolle (I, 7, 8) zeigen, daß die Viskosität in diesen Fällen nicht zunimmt.

Protokoll I.

1. Milch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden .	100	160	290	350	440	515	560	620	680	740
relat. Viskosität (Ausflußzeiten in Sek.)	15,8	15,8	16	16,2	16,6	17,6	18,6	21	27,2	geronnen

2. Milch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden .	157	272	422	607	717	832	892	936	987	1047	1100
relat. Viskosität	13,8	13,8	14	15,4	16,4	17,8	19	20,6	23	27	geronnen

3. Milch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden.	120	180	225	330	440	535	600
relat. Viskosität	15	15	15	15,4	16,7	22	geronnen

4. Milch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden.	108	258	402	575	670	800	906	1080	1140	1245	1300
relat. Viskosität	15,8	16	16,2	16,2	16,3	17,0	17,6	20	23	27,6	geronnen

5. Milch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden.	65	575	1098	1180	1225	1320	1380	1425	1495
relat. Viskosität	14	14	14	14,2	14,4	14,8	15	15,3	15,6
nach Sekunden.	1535	1590	1650	1740	1800	1864	1940	1980	—
relat. Viskosität	16	16,8	17,8	20	22	24,6	27,6	geronnen	—

6. Milch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden.	80	285	503	620	670	732	786
relat. Viskosität	15	15	15	15,2	15,4	15,6	15,9
nach Sekunden.	845	905	955	1020	1080	1140	1200
relat. Viskosität	16,2	17	17,5	19,2	21,2	24,6	geronnen

7. Oxalatmilch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden.	120	180	240	420	540	715	900	1165	1350
relat. Viskosität	20	20	20	20	19	19	18	19	19

8. Citratmilch 10 ccm, Lab 0,05.

nach Sekunden.	160	210	275	350	435	670	860	1080
relat. Viskosität	16	16	16	16	16	16	16,5	16

Jedenfalls darf in den obigen Versuchen ein Beweis dafür erblickt werden, daß der Fällungsvorgang schon weit früher, als bisher angenommen, sicher schon nach der halben Gerinnungszeit beginnt. Die Beobachtungen an sehr verdünnter Milch, welche eine sofort nach dem Labzusatz deutliche Zunahme der milchigen Trübung ergaben, lassen sogar vermuten, daß dieser, sei es hauptsächlich, sei es neben dem eigentlichen Umwandlungsprozeß einhergehend, einen allmählichen Agglomerationsprozeß der vorher kolloidal gelösten Teile der Milch repräsentiert.

Um die hier hervortretende Analogie der äußeren Erscheinungen des Labprozesses mit einfachen Fällungsvorgängen näher zu

verfolgen, haben wir Versuche mit Ammonsulfatfällung von Kolloiden, hauptsächlich mit kolloidalem Eisenhydroxyd und Milch angestellt. Es ergab sich nicht nur die Tatsache, daß auch hier die Fällung ein Vorgang ist, der meßbare Zeit beansprucht, sondern auch eine verkehrte Proportionalität zwischen dem wirksamen Agens — der Salzkonzentrationssteigerung — und der Fällungsdauer. (Prot. II, III.) Allerdings ist die Breite der Variationsmöglichkeiten nicht groß, da die niedrigste überhaupt wirksame und die sofort, d. h. die in unmeßbar kurzer Zeit wirkende Konzentration nahe beieinander liegen. Die untere Fällungsgrenze wurde in der Tabelle mit 23,5 Sättigungsprozenten angesetzt, die obere liegt bei 30 Proz.

Protokoll II.

Nr.	Milch	ges. $(NH_4)_2SO_4$-Lösung	H_2O	Fällungszeit in Sek.	Konzentrationssteigerung über 23,5 Proz. Sätt.	Produkt Konzentrationssteigerung × Zeit
1	5,0	2,5	2,5	168	1,5	252
2	5,0	2,6	2,4	120	2,5	300
3	5,0	2,7	2,3	100	3,5	350
4	5,0	2,8	2,2	72	4,5	324
5	5,0	2,9	2,1	52	5,5	286
6	5,0	3,0	2,0	45	6,5	293

Protokoll III.

Nr.	Milch	ges. $(NH_4)_2SO_4$-Lösung	H_2O	Fällungszeit in Sek.	Konzentrationssteigerung über 23,5 Proz. Sätt.	Produkt Konzentrationssteigerung × Zeit
1	5,0	2,45	ad 10 ccm	350	1,0	350
2	5,0	2,5		235	1,5	353
3	5,0	2,55		180	2,0	360
4	5,0	2,65		120	3,0	360
5	5,0	2,7		92,5	3,5	324
6	5,0	2,75		72	4,0	288
7	5,0	2,8		65	4,5	293
8	5,0	2,85		35	5,0	175

Über die Viskositätsverhältnisse solcher Fällungsvorgänge ergab sich, daß oberhalb einer bestimmten Konzentrationsgrenze die Viskosität vom Augenblick des Salzzusatzes allmählich und ziemlich gleichmäßig ansteigt, während sie in der Nähe der Fällung rasch hohe Werte erreicht. Als Beispiel eines solchen Versuches diene Prot. IV.

Protokoll IV.

5 ccm Eisenoxydlösung, 0,3 $(NH_4)_2SO_4$-Lösung.

nach Minuten .	2,8	4,47	9,20	15,55	20,7	23	25,40	28,6	30,50	34,5	35,30	37,40
relat. Viskosität	12	12,8	14	16	18,4	19,8	21	23,2	25,6	42,0	62,8	120,0

Bei Variation der Versuchstemperatur zeigte sich, daß jene Fällungsgrenze bei höherer Temperatur sehr viel niedriger liegt und auch die Viskosität schneller zunimmt.

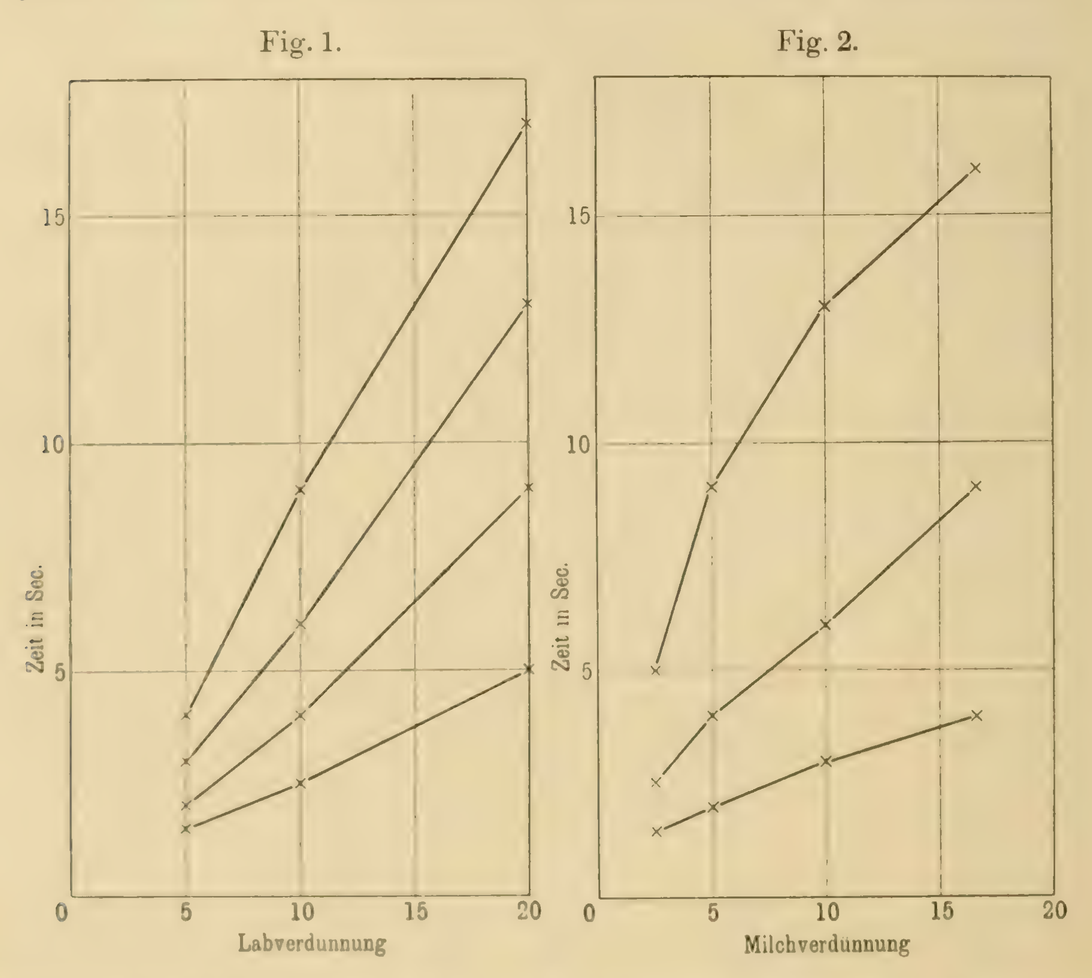
Ferner wurde auch noch die Hitzekoagulation von Eiweißlösungen am Serumeuglobulin viskosimetrisch verfolgt, wobei sich folgende interessanten Verhältnisse ergaben: Mit der Steigerung der Temperatur der Lösung geht zunächst eine gesetzmäßige Verringerung der inneren Reibung einher, jedoch nur bis zur Erreichung eines Minimums bei einem bestimmten Temperaturgrade (62°), ist dieser überschritten, so steigt die Viskosität wieder an, und zwar, soweit die bald eintretende Koagulation dies zu beobachten gestattet, rasch. Unterbricht man aber die Temperatursteigerung bei jenem ausgezeichneten Punkte und hält die Probe von nun an bei konstanter Temperatur, so zeigt sich eine den früheren Beobachtungen ganz analoge Zunahme der Viskosität, die wieder anfangs langsam, allmählich immer rascher bis zum Koagulationspunkt fortschreitet. Das Filtrat vom Koagulum verhält sich, wieder abgekühlt, bei neuerlicher Erwärmung genau so wie die ursprüngliche Euglobulinlösung, nur ist der absolute Wert der Viskosität jetzt ein geringerer, und es kommt nicht zu einer Umkehr der Kurve. Kühlt man die Euglobulinlösung während ihrer langsamen Hitzekoagulation, wobei sie schon anfängt opaleszent zu werden, ab, so vergrößert sich die innere Reibung mit der Temperaturabnahme, um bei Wiedererwärmen ihren früheren Wert gleich wieder anzunehmen. Schließlich ergaben noch weitere Vergleichsversuche, daß die auf Temperaturänderung beruhende Viskositätsverschiebung bei Kolloiden (Eisenhydroxyd) viel größere, aber gleichgerichtete Ausschläge gibt als bei Wasser, und zwar im Sinne einer Verminderung der Viskosität mit steigender Temperatur. Die Viskositätssteigerung nach Überschreitung eines gewissen kritischen Temperaturpunktes muß nach alledem als direkt unabhängig von der Temperatursteigerung und als Begleiterscheinung des Koagulationsvorganges aufgefaßt werden.

Die angeführten Versuche lehren, daß weder in der zeitlichen Gesetzmäßigkeit noch in der allmählichen Zustandsänderung ein

durchgreifendes Unterscheidungsmerkmal der Fällung durch Lab und derjenigen durch andere Agenzien, wie Salz und Hitze, erblickt werden kann.

3.

Der zweite der oben angedeuteten Wege zur Untersuchung des Verhältnisses von Umwandlungs- und Koagulationszeit liegt in dem Versuche einer zeitlichen Trennung der beiden Vorgänge. Nach der allgemein herrschenden Auffassung geht der Labungsprozeß in der Kälte ebenso vor sich wie in der Wärme, führt jedoch nicht zur Koagulation, welche erst bei entsprechender



Temperatursteigerung in der zur Erwärmung nötigen Zeit eintreten soll, vorausgesetzt, daß in der Kälte die für den Prozeß erforderliche Zeit verstrichen war.

Wir glaubten nun durch Zusammenbringen von Lab und Milch in der Kälte vielleicht zu einer Trennung der beiden Vorgänge zu gelangen; doch erwiesen sich im Gegensatz zu unserer Erwartung die allerdings kurzen Zeiten, welche zur Koagulation von in der Kälte gelabten Proben in der Wärme notwendig waren, als nicht

unabhängig von den Mengenverhältnissen von Milch und Lab. Nach einer Verbesserung der Versuchsmethodik, die darin bestand, daß wir nicht die ganze Probe, sondern nur ein bis zwei Tropfen davon in vorgewärmten Gläsern bei kräftigem Schütteln im Wasserbade beobachteten, konnte die Erwärmungsdauer praktisch völlig ausgeschaltet werden, und nun erwiesen sich, wie die wiedergegebenen Versuchsreihen (Prot. V, VI) zeigen, die äußerst kurzen Koagulationszeiten mit überraschender Genauigkeit als von denselben Gesetzen abhängig, die auch für die Labungszeiten der ganzen Proben in der Wärme hätten gelten müssen. Zeiten, die kleiner als 2″ sind, können begreiflicherweise nicht mehr exakt beobachtet werden, so daß die Gültigkeit des Labzeitgesetzes für etwas höhere Labgehalte nicht ohne weiteres (Prot. V, 4) zu erweisen ist. Doch gelingt es leicht, durch Milchverdünnung (Prot. VI) auch bei hohen Labwerten zu Zahlen zu gelangen, die das Gesetz $L . T = const$ bestätigen. Gleichzeitig zeigt diese Reihe die im ersten Teile der Arbeit festgestellte Abhängigkeit der Zeiten vom Verdünnungszustand (wie aus der Vergleichung der Kurven zu entnehmen ist). Weitere Versuche zeigten auch die im vorhergehenden nachgewiesenen Beziehungen der Gerinnungsdauer von Chlorcalcium und Rhodankalium (Prot. VII).

Protokoll V.

Nr.	Milch	Lab	Molke	nach 1 stünd. Stehen in der Kälte gerinnt 1 Tropfen erwärmt in Sek.	Konstanzzahl $T \times L$
1	8,0	0,1	ad 10 ccm	16	1,6
2	8,0	0,2		8	1,6
3	8,0	0,5		3	1,5
4	8,0	1,0		1—2	1—2

Protokoll VI.

Nr.	Lab	Molke	nach 1 stünd. Stehen in der Kälte gerinnt 1 Tropfen erwärmt in Sek. für Milch				Entsprechende Konstanzzahlen $L \times T$			
			0,6	1,0	2,0	4,0				
1	0,5	ad 10 ccm	17	13	9	5	8,5	6,5	4,5	2,5
2	1,0		9	6	4	2,5	9	6	4	2,5
3	2,0		4	3	2	1—2	8	6	4	2—4

Protokoll VII.

Nr.	Milch	Lab	2,0 ccm	Gerinnungszeit der Parallelprobe in Sek.	Gerinnungszeit nach Labung in der Kälte in Sek.
1	6,0	2,0	Molke	47	12
2	6,0	2,0	isoton. CNSK-Lös.	87	30
3	6,0	2,0	Molke + Spuren $CaCl_2$	10	1

Hierdurch erscheint erstens bewiesen, daß eine Unterscheidung zweier durch Kälte trennbarer Zeitanteile für Umwandlung und Koagulation in der üblichen Art hinfällig ist, und daß somit der ganze Prozeß seinem zeitlichen Verlaufe nach als einheitlich betrachtet werden kann, zweitens aber auch, daß die Labung in der Kälte nur unvollständig, und zwar bis zu einem von dem Labgehalt der Probe gänzlich unabhängigen Punkte abläuft und hier durch Erreichung eines sei es echten, sei es falschen Gleichgewichtes — jedenfalls praktisch — zum Stillstand kommt. Wir konnten die Proportionalität der Labungszeiten mit dem Labgehalt noch an stunden- bis tagelang in der Kälte stehenden Proben unverändert nachweisen.

Dieser Stillstand des Vorganges bietet wohl eine ausreichende Erklärung für das Ausbleiben der Fällung in der Kälte; er wäre am besten vielleicht mit der Tatsache in Analogie zu setzen, daß die Aussalzung von Eiweißkörpern unterhalb einer gewissen Konzentrationsgrenze, die hier der Temperatur zu vergleichen wäre, überhaupt nicht zu erreichen ist, obwohl auch tiefere Konzentrationen schon erhebliche Veränderungen in der Eiweißlösung im Sinne einer Vorbereitung der Fällung mit sich bringen.

Die in der Wärme noch zur Koagulation nötigen Zeiten kalter Proben verhielten sich zu denen von sogleich warmen Parallelproben ziemlich konstant wie 1 : 4 bis 1 : 5, was, wenn man die Leistung der ersparten Zeit proportional rechnet, 75 bis 80 Proz. der Arbeit entspräche. Die Zahl scheint niedriger zu liegen bei Proben mit verdünnter Milch (etwa 60 Proz.), sie liegt deutlich höher bei Gegenwart von Chlorcalcium (90 Proz.), etwas niedriger (70 Proz.) bei Gegenwart von Rhodankalium. Die Erreichung dieses Gleichgewichts dürfen wir uns nach den Angaben von E. Fuld über die Gültigkeit des einfachen Zeitgesetzes auch in der Kälte von diesem beherrscht vorstellen.

Die Auffassung scheint also gerechtfertigt, daß es sich in der Kälte um die Unterbrechung eines einheitlichen Vorganges, nicht um eine Trennung von zwei Vorgängen handelt; es wird also in der Kälte selbst durch die größten Labmengen jener thermolabile Punkt nicht erreicht, der oberhalb 20° durch jede Labmenge in entsprechender Zeit erreicht werden kann.

4.

E. Fuld hat den wichtigen Beweis erbracht, daß der zeitliche Ablauf des Labungsvorganges mit gleichförmiger Geschwindigkeit vor sich geht; er führte den Beweis dadurch, daß er eine in der Labung begriffene Probe mit gleichen Mengen frischer Milch versetzte und aus der Verschiebung, bzw. Nichtverschiebung des Zeitpunktes der Gerinnung im Vergleich zu Parallelproben auf die Geschwindigkeit des ganzen Vorganges schloß. Dasselbe Resultat erhielt er, als er Lab statt Milch nachträglich zufügte, was aber insofern nicht ganz einwandfrei ist, als hier die erst zu beweisende Annahme zugrunde lag, daß die verstrichene Zeit ein direktes Maß der geleisteten Arbeit sei. Die den Milchunterbrechungsversuchen zugrunde liegende Überlegung war hingegen stichhaltig, da hier die unbekannte Arbeitsleistung im Unterbrechungszeitpunkt auf die Hälfte herabgesetzt und der relative Wert dieser Hälfte gemessen wurde.

Bei der Wichtigkeit der Beziehungen zwischen Leistung und Zeit haben wir die Versuche Fulds wiederholt, auch weil die Unterbrechungen von ihm nur in einem ziemlich beschränkten Zeitintervall, nämlich der ersten Hälfte, mit Erfolg auszuführen waren. Wie Protokoll VIII zeigt, konnten wir die Angaben Fulds vollständig und sogar noch über die Hälfte der Gerinnungszeit bis zu $^2/_3$ derselben bestätigen.

Protokoll VIII.

Nr.	Milch	Lab	plus 5 ccm Milch nach Sekunden	Gerinnungszeit in Sekunden
1	4,5	0,5	—	45
2	9,5	0,5	—	76
3	4,5	0,5	10	76
4	4,5	0,5	20	77
5	4,5	0,5	30	77
6	4,5	0,5	35	69
7	4,5	0,5	40	63

Das Gesetz der gleichmäßigen Geschwindigkeit $\frac{da}{dt} = const$, worin a die jeweils geleistete Labungsarbeit bedeutet, geht in $a = kt$ und für den Zeitpunkt der Gerinnung in $A = konst\ T$ über, worin A die bei konstanten Volumsverhältnissen in jedem Labungsvorgange bis zur Gerinnung identische Leistung bedeutet. Im Zusammenhalt mit der bekannten Beziehung $T . L = const$ ergibt sich hieraus $\frac{A}{T} = \frac{a}{t} = const\ L$ oder $\frac{a}{t . L} = const$, welche Gleichung die Beziehung der drei Variabeln: Arbeit, Zeit und Ferment, erschöpfend ausdrückt. Daraus geht aber hervor, daß erstens das Produkt aus Fermentmenge und verstrichener Zeit in jedem Falle bei gleicher Arbeitsleistung — nicht bloß im Gerinnungszeitpunkt — konstant ist, und daß sich zweitens in verschiedenen Proben nach gleichen Zeiten die vollzogene Leistung und die Fermentmenge einfach und gerade proportional verhalten: $\frac{a}{L} = const.$

Als Massengesetz einer chemischen Reaktion aufgefaßt, besagt dieser Ausdruck einerseits die Unveränderlichkeit des Fermentes während der Reaktion, andererseits aber die erstaunliche Tatsache der völligen Unabhängigkeit der Reaktionskonstante von der noch zu leistenden Arbeit $(A - a)$, die der jeweilig noch nicht umgewandelten Masse entsprechen muß.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse beim Pepsin, auf dessen Gesetze wir deswegen eingehen wollen, weil das sogenannte Zeitgesetz (Wirkungsgesetz) des Pepsins nach Schütz-Borissow mit dem des Labs nicht selten zusammengeworfen und aus dem Unterschiede beider auf das Wesen des Labungsvorganges geschlossen wird. Beim Pepsin lassen sich die Verhältnisse auch deswegen besser darstellen, weil wir das Wesen der fermentativen Umwandlung genauer kennen und sie auch messen können.

Zunächst ist zu bemerken, daß die Funktion Zeit zu Ferment beim Pepsin genau demselben Gesetz folgt wie beim Lab: $t . F = const.$ Schon Brücke hat ausgesprochen, daß zur Lösung gleicher Fibrinflocken der Fermentmenge umgekehrt proportionale Zeiten nötig sind. Sjöqvist zeigte 1895, daß die peptische Leistung derjenigen Proben, für die das Produkt: Zeit mal Ferment, dasselbe war, mit ziemlicher Annäherung konstant war. Dieselbe Tatsache läßt sich auch ohne weiteres aus Versuchsprotokollen von E. Schütz und Huppert berechnen. Es ergibt sich aus der auf

S. 499 mitgeteilten Versuchsgruppe, daß z. B. die Leistung von 10 g sekundärer Albumose in drei Stunden von der Pepsinmenge 1,618, in 12 Stunden von 0,4255 erbracht wurde, so daß sich die Konstanzzahlen Pepsin . Zeit 4,854 und 5,106 ergeben (Fehler = 4,93 Proz.); in der unmittelbar folgenden Kolonne werden die Zahlen 4,746 und 5,041 (Fehler = 5 Proz.).

Für die Funktion Arbeit zu Zeit stellen einerseits Schütz und Hupppert, andererseits Sjöqvist verschiedene Abhängigkeiten auf. Die ersteren finden eine quadratische Beziehung: $a^2/t = const$ (a Leistung), die zusammen mit der viel erwähnten Regel von Schütz-Borissow $a^2/F = const$ ohne weiteres die Gleichung $\frac{a^2}{t.F} = const$ und somit für gleiche Leistungen die Brückesche Regel $t.F = const$ ergibt. Es ist ersichtlich, daß die letztere Regel einfach durch die formale Gleichheit der beiden anderen Gleichungen gegeben ist; dieselbe einfache Funktion der Arbeit, nämlich ihr Quadrat, ist sowohl der Zeit- wie der Fermentmenge direkt proportional.

Die Schütz-Borissowsche Regel $a^2/F = const$ ist dem oben für das Lab entwickelten Gesetze $a/L = const$ analog und daher nur mit diesem zu vergleichen. Daß beim Pepsin das Quadrat der Arbeit der Fermentmenge proportional ist, haben F. Hofmeister und J. Schütz aus einer Dissoziation dieses Fermentes erklärt. Im übrigen besteht aber völlige Identität der beiden Gesetze. Auch beim Pepsin kommt in der Massengleichung die noch vorhandene Masse nach dieser Fassung nicht vor. Durchaus analoge Gesetze $\frac{a^2}{t.F} = const$ wurden von Volhard und dessen Schülern für die Wirkung des Steapsins aufgestellt und bestätigt.

Sjöqvist hingegen geht von der Geschwindigkeitsgleichung $\frac{da}{dt} = const\ F$ (Eiweiß — a) aus, welche die normalen Verhältnisse chemischer Massenwirkung einfach auf den Fermentvorgang überträgt, und kann deren Integral $F = \frac{k}{t} \cdot log \frac{\text{Eiweiß}}{\text{Eiweiß} - a}$ durch seine Versuche bestätigen. Mit dieser Fassung wären die Schwierigkeiten des Massengesetzes vermieden, ebenso wie auch die Notwendigkeit der Annahme einer Dissoziationswirkung bei dem einen Ferment. Doch hält Sjöqvist selbst die Breite seiner Versuchsanordnung nicht für genügend, um allgemeinere Schlußfolgerungen auf jene Formeln zu stützen. Jedenfalls geht auch hier aus der

formalen Gleichheit der Funktionen F und t von a die Brückesche Regel $F.t = const$ für konstantes a und gleiche Eiweißmengen hervor.

Literatur.

[1]) E. Fuld: Ergebnisse der Physiologie **1**, 468; daselbst die Literatur; auch diese Beiträge 2, 169.

[2]) Schütz-Huppert: Pflügers Archiv **80**.

[3]) Sjöqvist: Skandinavisches Archiv für Physiologie **5**.

[4]) J. Schütz: Zeitschr. f. physiol. Chemie **30**, 1.

III.

Über den Abbau des Cholins im Tierkörper.

Von Dr. **Heinrich von Hoesslin.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Straßburg und der II. medizin. Klinik in München.

---

1. Vorbemerkungen.

In unserer Nahrung ist Lecithin in solcher Menge enthalten, daß es bei Betrachtung der Stoffwechselvorgänge nicht ganz vernachlässigt werden darf. Zumal mit Eigelb, Gehirn, Milch und Fleisch werden größere Mengen davon eingeführt. Aber auch durch die normale physiologische Abnutzung der lecithinreichen Gewebselemente, z. B. der Blutscheiben, der Leukocyten, der Magen- und Darmepithelien usf. muß im Organismus immer wieder eine nicht unerhebliche Menge Lecithin frei werden. Wie der Organismus darüber verfügt, ist durchaus unbekannt.

Etwas besser sind wir über das Schicksal des Nahrungslecithins unterrichtet. Nach den Untersuchungen von Stassano und Billon[1]) sowie von Slowtzoff[2]) kommt innerlich eingeführtes Lecithin sicher zum Teil unverändert zur Resorption. Andererseits liegen Tatsachen dafür vor, daß ein erheblicher Teil des Nahrungslecithins schon innerhalb des Darmes durch Fermente, vor allem durch Steapsin in Cholin, Fettsäuren und Glycerinphosphorsäure gespalten wird [Bókay[3]), Nesbitt[4]), Kutscher und Lohmann[5]), Paul Mayer[6])].

Über das Schicksal des dabei im Darm aus dem Lecithin entstehenden Cholins liegen nur sehr spärliche Angaben vor. Hasebroek[7]) hat vor längerer Zeit gefunden, daß das Cholin

---

1) Compt. rend. Soc. Biol. 55, 482.
2) Diese Beiträge 7, 508.
3) Zeitschr. f. physiol. Chemie 1, 157.
4) Journal of exp. Medicine 4, 1.
5) Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 159.
6) Berliner klin. Wochenschrift 1905, Nr. 35.
7) Zeitschr. f. physiol. Chemie 12, 148.

durch Schlammbakterien bei wochenlangem Stehen allmählich zu Kohlensäure, Sumpfgas und Ammoniak zerlegt wird. Es ist aber von vornherein sehr wenig wahrscheinlich, daß das gesamte aus dem Nahrungslecithin abgespaltene Cholin diesem Schicksal verfällt, da es bei seiner großen Löslichkeit und Diffusibilität nicht lange unresorbiert im Darm verweilen dürfte. Überdies habe ich in nicht weiter anzuführenden eigenen Kulturversuchen mit Bacterium coli und Proteus Zerfall des zugesetzten Cholins, bzw. Abspaltung von Methyl- und Oxäthylgruppe vermißt. In der Tat vermochte inzwischen Slowtzoff nach Verfütterung von Lecithin weder unverändertes Lecithin, noch Cholin oder Glycerinphosphorsäure im Darmkanal unterhalb des Duodenum nachzuweisen. Nach Zufuhr von Cholin wies Nesbitt in einem Falle auch dieses im Chylus nach.

Zu der Tatsache, daß Cholin im Darm zur Resorption gelangt, gesellt sich weiter der Befund, daß es nicht im Harn zur Ausscheidung kommt. Im normalen Harn fehlt es nach Hoppe-Seyler und Gumprecht[1]) stets. Nach intravenöser Injektion soll es nach Mott und Halliburton[2]) (Dosis bis 0,02 g), sowie Donath[3]) nicht in den Harn übergehen; Gumprecht fand es nach subkutaner Dosis von 1,0 g. Ich selbst habe es beim Kaninchen nach Verfütterung und subkutaner Einspritzung stets im Harn vermißt. Danach muß das Cholin im intermediären Stoffwechsel entweder weiter verwendet werden oder, was mehr Wahrscheinlichkeit für sich hat, es wird abgebaut und die Endprodukte finden sich im Harn wieder.

Um diese Frage zu entscheiden, habe ich auf Anregung von Prof. Hofmeister untersucht, ob die Einführung von Cholin zur Ausscheidung von Ameisensäure, Glyoxylsäure oder irgendwelchen am Stickstoff methylierten Derivaten Anlaß gibt.

Es war nämlich bezüglich des Abbaues des Cholins in erster Linie daran zu denken, daß das Cholin als mehrfach methylierte Verbindung zunächst seine Methylgruppen einbüßt.

Eine solche physiologische Entmethylierung ist in einer ganzen Anzahl von Fällen sichergestellt. So entstehen im Tierkörper aus Trimethylxanthin di- und monomethylierte Xanthine [Albanese[4]),

---

[1]) Verhandlungen d. Kongr. f. innere Med. 1900.

[2]) Proceedings of the Royal Society CXV, 91. — Britisch med. Journal 1902, p. 925.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 526.

[4]) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 35, 449.

Bondzyński und Gottlieb[1]), Salomon[2]), Thudichum[3]), Krüger[4])]. Daß nach Darreichung größerer Dosen diese Entmethylierung nicht bei der gesamten eingeführten methylierten Substanz statthat, geht daraus hervor, daß Schutzkwer[5]), Maly und Andreasch[6]), sowie Rost[7]) erhebliche Mengen von eingeführtem Koffeïn unverändert im Harn wiederfanden. Andererseits scheint bei den Purinbasen die Entmethylierung nicht über die Bildung von Monomethylderivaten vorzuschreiten. Krüger und Schmidt[8]) erhielten nach Trimethylxanthinfütterung beim Kaninchen kein Xanthin, ebenso nicht Jaffé[9]).

Eine analog verlaufende Methylabspaltung vom Stickstoff hat ferner nach Hildebrand[10]) statt bei Dimethylaminotoluidin und Benzbetaïn, und neuerdings stellte Jaffé[11]) eine Mono-p-methylaminobenzoësäure nach Einverleibung des Dimethylaminobenzaldehyds dar; die gleiche Abspaltung erfolgt beim Dimethylaminoantipyrin (Pyramidon).

Es mußte danach für das Cholin ein Abbau zu Methyloxäthylamin erwartet werden.

$$HO{-}N\begin{cases}CH_3\\CH_3\\CH_3\\CH_2.CH_2OH\end{cases} + H_2O = 2\ CH_3OH + N\begin{cases}H\\CH_3\\CH_2.CH_2OH.\end{cases}$$

Da nun Pohl[12]) nachgewiesen hat, daß nach Darreichung von Methylalkohol Ameisensäure im Harn auftritt, so mußte, wenn diese Annahme richtig war, der Abbau des Cholins zu vermehrter Ausscheidung von Ameisensäure führen. Freilich war an eine quantitativ entsprechende Ausfuhr der Ameisensäure nicht zu denken, da diese, wie wir durch Pellacani[13]), Schotten[14]) und Pohl[15]) wissen, in erheblichem Umfange verbrannt wird. Pohl fand in

[1]) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 36, 45 u. 127; 37, 385.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 11, 410.
[3]) Zit. Salomon.
[4]) Chem. Berichte 32, 2280.
[5]) Diss. Königsberg 1883.
[6]) Mon. Chem. 1883.
[7]) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 36, 56.
[8]) Ibidem 45, 259.
[9]) Zit. Rost.
[10]) Diese Beiträge 7, 434 u. 440.
[11]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 43, 374.
[12]) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 31, 281.
[13]) Zit. Pohl.
[14]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 7, 375.
[15]) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 31, 288.

zwei Versuchen einmal 5,8 Proz., das andere Mal 18 Proz. in den nächsten 24 Stunden wieder. Er ist der Ansicht, daß kleinere Mengen völlig verbrannt werden, ein Mehr jedoch zum Teil unverändert ausgeschieden wird; Pellacani erhielt bis 7 Proz., Schotten bis 26 Proz. wieder. Jedenfalls also hält sich die Oxydation innerhalb ziemlich weiter Grenzen.

Die Oxydation eingeführten Methylalkohols erfolgt nur allmählich, so daß die Hauptmenge des Oxydationsproduktes erst am zweiten oder dritten Tage erscheint (Pohl). Die Quantität der ausgeschiedenen Ameisensäure schwankt beträchtlich; ein Parallelismus zum eingeführten Methylalkohol besteht nicht. Rechnet man in Pohls Versuchen das Plus der Formiatmenge für die verschiedenen Tage zusammen, so ergibt sich z. B. ein solches von

2,467 g	bei	60 ccm	Methylalkohol
2,275 „	„	35 „	„
0,863 „	„	48 „	„
0,024 „	„	16 „	„
0,307 „	„	10 „	„

Wenn die Entmethylierung des Cholins bis zur Bildung des Monomethylderivates geht, so ist dann an einen weiteren Abbau des Methyloxäthylamins zu Methylamin und Glykol oder zu Methylalkohol und Oxäthylamin zu denken, zumal sich bei der Oxydation des Cholins mit Wasserstoffsuperoxyd das Auftreten von Glyoxylsäure nachweisen läßt.

$$N \begin{cases} H \\ CH_3 \\ CH_2CH_2OH \end{cases} + H_2O = NH_2 . CH_3 + CH_2OH . CH_2OH$$

oder

$$NH_2 . CH_2 . CH_2OH + CH_3OH.$$

In beiden Fällen war, da Methylamin wie Methylalkohol im Tierkörper Ameisensäure gibt (Pohl), neben Ameisensäure das Auftreten von Oxydationsprodukten des Glykols, bzw. des Oxäthylamins zu erwarten, wobei in erster Reihe an Glyoxylsäure (COOH . COH), in zweiter an Oxalsäure gedacht werden mußte, worauf übrigens schon Hasebroek hingedeutet hat.

Da im Organismus der Abbau vielfach durch Synthesen kompliziert wird, so wurde noch eine andere Möglichkeit berücksichtigt, nämlich die Anlagerung eines Guanidinrestes nach erfolgter Entmethylierung. Aus dem so gebildeten Methyloxäthylamin könnte unter Oxydation der Oxäthylgruppe Kreatin entstehen und dieses als Kreatinin im Harn erscheinen:

$$N \begin{cases} H \\ CH_3 \\ CH_2CH_2OH \end{cases}$$

$$\rightarrow N < \begin{matrix} (CH_3).C(NH).NH_2 \\ CH_2.CH_2OH \end{matrix} \rightarrow N < \begin{matrix} (CH_3).C(NH).NH_2 \\ CH_2.COOH \end{matrix}$$

Eine solche Anlagerung eines Guanidinrestes ist freilich bisher nicht für den Tierkörper nachgewiesen. Auch hat Albanese bei seinen Koffeïnversuchen das Kreatinin nicht vermehrt gefunden, ebenso nicht Schutzkwer. Immerhin schien es zweckmäßig, auf eine etwaige Vermehrung des Kreatinins zu achten.

Endlich war noch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das Cholin wider Erwarten der Entmethylierung nicht unterläge und methylierte Derivate davon im Harn zur Ausscheidung kämen. In diesem Falle mußte es möglich sein, mit der Methode von Herzig und Hans Meyer zur Bestimmung von Alkylgruppen am Stickstoff das Auftreten solcher Verbindungen im Harn sicher zu stellen.

2. Untersuchungsmethoden.

Wie weit die Annahme der besprochenen Möglichkeiten Berechtigung hat, soll in den folgenden Versuchen gezeigt werden.

Das als Ausgangsmaterial dienende Bromwasserstoffsalz des Cholins wurde nach Krüger und Bergell[1]) aus Trimethylamin und Äthylenbromid dargestellt mit der kleinen Modifikation, daß das Trimethylamin behufs Destillation langsam in ungelöschten Kalk tropfte und durch die so gebildete Wärme überging. Das erhaltene Hydrobromid schmolz nach Umkristallisation aus Alkohol und kaltem Äther bei 239° unter Zersetzung.

Die wiederholte Bestimmung der Methyle am Stickstoff ergab innerhalb der gestatteten Fehlergrenzen als Mittwert 24,7 Proz. $(CH_3)_3$ (berechnet 24,52 Proz.).

Die Bestimmung der Ameisensäure geschah nach Scala[2]) und Pohl durch Übertreiben derselben mit wenig überhitztem Wasserdampf aus dem mit Phosphorsäure angesäuerten Harn.

Von der Phosphorsäure muß so viel zugesetzt werden, daß nach Neutralisation des aus dem Harnstoff abgespaltenen Ammoniaks und Überführung der Basen in saure Salze noch freie Säure wirksam bleibt. Hierfür genügten 30 ccm H_3PO_4 in 25 proz. Lösung auf 100 ccm Urin [Rokitansky[3]), Pohl]. Es wurde so lange destilliert, bis in einer Probe Sublimat nur noch in unmerklicher Weise reduziert wurde, was häufig noch nach Übertreibung der freien Salzsäure oder Aufhören der sauren Reaktion des Destillats stattfand. Dies dauerte mindestens 12 Stunden, meist noch länger. Das Destillat wurde

---

[1]) Chem. Berichte 36, 2901.

[2]) Ibid. 23, 599.

[3]) Wiener med. Jahrbücher 1887.

in reiner Natronlauge aufgefangen, auf dem Wasserbade eingedampft, ein aliquoter Teil mit Essigsäure leicht angesäuert und mit konzentrierter Sublimatlösung versetzt. Es muß dabei stark eingedampft werden, da sonst nicht alles Sublimat reduziert wird.

Eine quantitative Bestimmung der Glyoxylsäure unterblieb mangels genügender Methoden; auf ihr Vorhandensein wurde qualitativ nach Inada[1]) mit Indol, bzw. Skatol und Schwefelsäure geprüft; die von Inada angegebenen Fehlerquellen wurden genau berücksichtigt.

Auf die Bestimmung der Oxalsäure wurde verzichtet. Wenn man nämlich die Mengen Oxalsäure berechnet, die sich bestenfalls aus dem verfütterten Cholin bilden könnten und mit den großen von Eppinger[2]) verfütterten Glyoxylsäuremengen vergleicht, die doch nur geringe Vermehrung der Oxalsäure hervorgebracht hatten, so ergibt sich, daß keine außerhalb der Fehlergrenze liegende Steigerung der Ausscheidung zu erwarten war.

Kreatinin wurde einige Male als Kreatininchlorzink bestimmt, im übrigen die Weylsche Farbenreaktion nach entsprechender Harnverdünnung angewandt.

Behufs Ermittelung etwa in den Harn übergehenden Methylstickstoffs nach Herzig und Hans Meyer[3]) wurde der Harn zunächst durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure und Baryumchloridfällung schwefelsäurefrei gemacht, ein Teil, meist 20 ccm, eingedampft und direkt untersucht, ein anderer mit Alkohol extrahiert, der Alkohol sorgfältig durch mehrmaliges Auffüllen mit Wasser und Abdampfen entfernt; dann wurde wie bei der direkten Methode verfahren.

Zum Nachweis des etwa unverändert im Harn erscheinenden Cholins diente seine Fällbarkeit mit Jodwismutkalium unter Vermeidung der bekannten Schwierigkeiten, die sich einerseits aus der Bildung basischer Wismutsalze, andererseits aus der Löslichkeit des Cholindoppelsalzes in überschüssiger Säure ergeben.

Die Gewinnung aus Urin gestaltet sich am einfachsten in der Weise, daß man ein kaltes Alkoholextrakt aus diesem herstellt, mit Salzsäure genau neutralisiert und so viel 1 proz. Salzsäure zusetzt, daß auf je 2 ccm Extrakt 0,1 ccm dieser Lösung treffen, eventuell auch 0,2 ccm. Kaninchenharn allein gibt nach dieser Methode keinen Niederschlag, wohl aber nach Zusatz von Cholin. Es lassen sich so in 10 ccm Urin 0,005 g Cholin (Bromwasserstoffsalz) nachweisen. Quantitativ ließ sich die Methode nicht ausarbeiten.

---

[1]) Diese Beiträge 7, 473.

[2]) Diese Beiträge 6, 492.

[3]) Analyse und Konstitutionsermittelung organischer Verbindungen. 2. Aufl. 1903. S. 571.

3. Versuche.

Das Cholinhydrobromat wurde Kaninchen und zwar zunächst per os, später subkutan beigebracht. Eine in die Augen springende physiologische Wirkung rief es in keinem Falle hervor. — Nach Boehm[1]) vertrugen Kaninchen subkutane Injektion des Chlorids bis 0,7 g gut; bei Fröschen bewirkten 0,025 bis 0,1 g regelmäßig Paralyse, bei Katzen 0,3 g; nach 0,5 g erfolgte der Tod. Desgrez und Aly Zaky[2]) beobachteten trotz monatelanger Fütterung gleichfalls keine besondere Wirkung.

Tabelle.

Nr. des Versuchs	Datum	Gewicht Cholin BrH g	Harnmenge ccm	Natriumformiat g	Berechnete (CH_3)-Gruppen g	Glyoxylsäure	Kreatininreaktion	Cholin	Bemerkungen
I.	10. XII. 04	ø	750	1,057	—	—	pos.	ø	Versuch I bis III am nämlichen Tier ausgeführt. Es wurde ausschließlich mit Grünkohl gefüttert.
	11.	ø							
	12.	0,5 per os	550	1,706	—	—	pos.	ø	
	13.	ø							
	14.	ø	700	0,735	—	—	stark pos.	ø	
	15.	ø							
	16.	ø							
II.	2. I. 05	ø	530	0,445	0,1504	—	0,572 pro die	ø	
	3.	ø							
	4.	1,0 per os	230	0,480	0,1835 pro die	—	0,585 pro die	ø	
	5.	0,75 „	480	1,448					
	6.	ø	400	0,947	0.2535 pro die	—	pos.	ø	
	7.	ø	400	0,456					
	8.	ø	330	0,496	0,2807 pro die	—	pos.	ø	
	9.	ø	260	0,605					
III.	22. I. 05	ø	700	1,795?	0,4080	ø	pos.	ø	
	23.	1,0 per os	500	0,728	0,1539	?	pos.	ø	
	24.	ø	620	1,072	0,4260	ø	pos.	ø	
IV.	26. III. 05	ø	300	0,184 pro die	0,1714 pro die	ø	pos.	ø	Versuch IV bis VIII am nämlichen Tier ausgeführt. Es wurde mit Hafer und wenig Grünzeug gefüttert.
	27.	ø	500						
	28.	0,7 per os	500	1,019 pro die	0,1018 pro die	pos.	pos.	ø	
	29.	ø	400						
	30.	ø	400	0,329 pro die	0,0569 pro die	ø	pos.	ø	
	31.	ø	300						
	1. IV. 05	ø	400	0,185 pro die	—	—	—	—	
	2.	ø							

[1]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 19, 87.
[2]) Compt. rend. de biol. 60.

Nr. des Versuchs	Datum	Gewicht Cholin BrH g	Harnmenge ccm	Natriumformiat g	Berechnete (CH_3)-Gruppen g	Glyoxylsäure	Kreatininreaktion	Cholin	Bemerkungen
V.	9. IV. 05	ø	500	0,587 pro die	0,0890 pro die	ø	pos.	ø	
	10.	ø	400						
	11.	2,0 per os	500	0,470 pro die	0,1960 pro die	ø	pos.	ø	
	12.	ø	300						
	13.	ø	200	0,567 pro die	0,0313 pro die	ø	pos.	ø	
	14.	ø	200						
VI.	7. VI. 05	ø	200	0,884	0,0345	ø	schw. pos.	ø	
	8.	ø	200	0,904	—	ø	"	ø	
	9.	0,9 per os	200	—*)	0,0536	ø	"	ø	*) Bestimmung vom 9. fehlt.
	10.	ø	300	0,808	0,0775	ø	"	ø	
VII.	25. VI. 05	ø	200	0,163	—	ø	"	ø	
	26.	0,8 subkut.*)	200	0,788	0,0292	ø	"	ø	*) Im Laufe von 6 Stunden beigebracht.
	27.	ø	verl.	—	—	—	—	—	
	28.	ø	verl.	—	—	—	—	—	
	29.	ø	200	0,186	—	ø	schw. pos.	ø	
VIII.	12. VII. 05	ø	200	0,173	Spuren	ø	"	ø	
	13.	0,9 subkut.*)	200	0,728	—	ø	—	ø	*) Im Laufe von 3 Stunden beigebracht.
	14.	ø	250	0,242	Spuren	ø	—	ø	
	15.	ø	200	0,152	—	ø	—	ø	

4. Versuchsergebnisse.

Als Resultat dieser Versuche ergibt sich folgendes: Das Cholin ist als solches niemals im Harn wiederzufinden, muß also, soweit es unverändert zur Resorption gekommen ist, im Körper zersetzt worden sein[1]).

Die Ameisensäureausscheidung zeigt schon normalerweise eine ziemliche Inkonstanz, für die ich keine Erklärung finde. Auch Pohl sah bei Hunden Schwankungen bis über 0,1 g. Trotzdem ist der Einfluß der Cholinzufuhr auf die Formiatausscheidung nicht zu verkennen. Er tritt bei innerlicher Darreichung in drei von fünf Versuchen (I, II und IV) unzweifelhaft hervor[2]) und ist in den zwei Versuchen mit subkutaner Einverleibung scharf ausgesprochen.

[1]) Nebenbei will ich bemerken, daß es mir bisher nicht gelang, dasselbe in menschlicher Cerebrospinalflüssigkeit nachzuweisen.

[2]) Versuch VI, wo die Bestimmung gerade am entscheidenden Tage fehlt, kann nicht mitgezählt werden.

Die Versuche III und V, in denen die Vermehrung der Formiatausscheidung nach innerlicher Cholinzufuhr fehlt, zeigen beide hohe Anfangszahlen, für die ich weiter keine Erklärung habe. Die auffällige Ausgangsziffer in Versuch III konnte nicht, wie wünschenswert gewesen wäre, durch eine Parallelbestimmung kontrolliert werden. Auch die positiven Ergebnisse waren anscheinend durch Schwankungen der normalen Formiatausscheidung kompliziert. In Versuch I betrug die ausgeschiedene Formiatmenge 0,6487 g statt 0,5524 g; man ist genötigt, hier eine normale Schwankung von fast 0,1 g anzunehmen, selbst bei vollständiger Überführung aller drei Methylgruppen in Ameisensäure. Noch exzessiver ist die Vermehrung in Versuch IV, nämlich etwa 2,0 g statt 0,7734 g. Auch eine Oxydation der C_2H_4OH-Gruppe des Cholins bis zur Ameisensäure reicht nicht zur Erklärung.

Die beweiskräftigsten Resultate geben die Versuche mit subkutaner Einspritzung; in dem einen wurden 71,8 Proz., in dem anderen 70,8 Proz., also über zwei Drittel des N-Methyls, als Ameisensäure wiedergefunden. (Bei Versuch VII ist allerdings ein kleiner Verlust anzunehmen.)

Es wird demnach ein größerer oder kleinerer Teil der abgesprengten N-Methylgruppen zu Ameisensäure oxydiert, der restliche Teil darüber hinaus vermutlich zu CO_2 und H_2O. Dies steht in Einklang mit Pohls Beobachtungen.

Die Frage, ob ein Teil vom methylierten Stickstoff in irgendeiner Form in den Harn übergeht, scheint mir durch die NCH_3-Werte in obigen Versuchen im wesentlichen beantwortet und zwar in verneinendem Sinne.

Auch hier schwanken die Werte im normalen Harn beträchtlich; die Schwankungen überschreiten die erlaubte Fehlergrenze des Herzig-Meyerschen Verfahrens. Daß aber die täglichen Schwankungen in der Jodsilbermenge schon normalerweise groß sein können, beweisen die Resultate Herrmanns, denn bei der N-Methylbestimmung im Harn kommen noch andere einen Jodsilberniederschlag gebende Stoffe in Betracht. Wären auch nur kleinere Mengen des Methyl-N im Harn wiedererschienen, so hätte die Vermehrung des Jodsilberniederschlags viel konstanter sein müssen und es hätte jedenfalls keine Verminderung der Gesamt-N-Methylmenge eintreten dürfen, wie dies öfters der Fall war.

Glyoxylsäure wurde nur einmal in Versuch IV und zwar nach Cholinzufuhr sicher nachgewiesen. Obwohl der Übergang der Oxäthylgruppe in diese sehr wahrscheinlich ist, möchte ich diesen einzigen positiven Ausfall noch nicht als beweisend erachten. — Bei reiner Haferkost oder Hunger habe ich die Reaktion allerdings nie erscheinen sehen. Jedenfalls bedarf dieser Punkt weiterer Untersuchung.

Die Kreatininreaktion fiel bei jeder Versuchsreihe gleich stark aus, außer in der ersten; der eine quantitative Versuch ergab gleichfalls keine Vermehrung.

Es resultiert also ein Abbau des Cholins im Tierkörper, unter intermediärer Bildung von Ameisensäure, vielleicht auch von

Glyoxylsäure. Da Ameisensäure in geringer Menge im normalen Harn vorkommt, reichlicher im Harn von Fiebernden und von Leukämikern, so ist daran zu denken, daß sie auch in diesen Fällen aus dem Cholin der Nahrung, bzw. aus dem Lecithin zerfallender Zellen herrührt.

Wenig wahrscheinlich, wenngleich nicht ausgeschlossen, ist, daß die Essigsäure des Harns zum Teil von der Oxäthylgruppe abstammt. Eher ist hingegen auf Grund der Beobachtungen Eppingers, die die Überführbarkeit von Glyoxylsäure in Oxalsäure im Tierkörper beweisen, daran zu denken, daß der Cholinzerfall eine Quelle der normalen und pathologischen Oxalsäureausscheidung bildet.

Es ist aber nach dem Gesagten keineswegs als ausgemacht anzusehen, daß die aus Cholin abgespaltenen Methyle gänzlich über Ameisensäure oxydiert werden. Vielmehr ist noch eine weitere Möglichkeit ins Auge zu fassen.

Durch eine Reihe physiologischer Tatsachen ist nämlich für pflanzliche und tierische Organismen die Fähigkeit der Methylierung dargetan. Bei den Pflanzen erscheint die Methylierung als ein einzelner Fall der überaus großen Zahl synthetischer Vorgänge. Bei den Tieren tritt sie aber zum Teil unter Bedingungen auf, die eine weitere Nachforschung nach ihrem Zustandekommen aussichtsvoll erscheinen lassen.

Als erster fand His[1]) bei Pyridinverfütterung die Anlagerung einer Methylgruppe an den Stickstoff desselben. Hofmeister[2]) konstatierte dann nach Einnahme von Selen und Tellur in den meisten Organen und auch in der Ausatmungsluft das Auftreten von Tellur- bzw. Selenmethyl. Weiterhin konnte Hildebrandt[3]) nach Verfütterung von Thymotinpiperidid eine methylierte Base, gepaart mit Glykuronsäure aus dem Urin isolieren. Von Neuberg und Salomon[4]) wurde endlich nach Xanthineinnahme bei Hunden im Harn 7-Methylxanthin isoliert, das normalerweise hier nicht vorkommt und somit vielleicht durch Methylierung im Tierkörper entstanden ist.

Die Erfahrungen über Tellurmethylbildung an isolierten blutfreien Organen haben Hofmeister zu der Vorstellung geführt, daß die Methylgruppe im Gewebe in einer chemischen Verbindung,

---

[1]) His, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 22, 253.
[2]) Hofmeister, Ebenda 33, 198.
[3]) Hildebrandt, Ebenda 44, 278.
[4]) Neuberg und Salomon, Festschr. f. E. Salkowski 1904, S. 37.

etwa ähnlich dem Methyljodid, vorhanden sei, welche dessen Abgabe an das hinzutretende Tellurid möglich erscheinen läßt. Er ließ dabei offen, ob dieser Vorgang rein chemischer Natur ist oder die Mitwirkung eines unbekannten fermentativen oder anders gearteten Zwischenvorganges voraussetzt. Beim Zusammenbringen von Chlor-, Jodmethyl, mono- oder dimethylphosphorsaurem Natrium mit Tellurnatrium in wässeriger Lösung kam es sofort zu einer reichlichen Bildung von Tellurmethyl; weniger leicht reagierten methylschwefelsaure Salze und die Methylester organischer Säuren. Trimethylamin und Tetramethylammoniumchlorid gaben gar kein, Oxymethansulfosäure und Methylamin unter bestimmten Bedingungen nur wenig Tellurmethyl. Demgegenüber ist es von Wichtigkeit, daß Cholin, wie ich auf Wunsch von Herrn Prof. Hofmeister feststellte, nach Zusammenbringen mit Tellur unter bestimmten Bedingungen den charakteristischen Tellurmethylgeruch gibt, nicht aber frisches Lecithin.

Danach scheint Cholin gegenüber Tellur viel leichter Methyl abzuspalten als die sonst so nahe stehende Tetramethyliumverbindung und es ist die Vermutung nahe gerückt, daß die Tellurmethylbildung im Tierkörper mit einer intensiver erfolgenden Abspaltung von Cholin aus vorgebildetem Lecithin in Beziehung steht. Ob die anderen Methylierungsvorgänge eine ähnliche Deutung zulassen, bleibt noch zu untersuchen. Nur sei gestattet, darauf hinzuweisen, daß das Vorkommen des methylärmeren Kephalins neben Lecithin im Gehirn[1]) sich durch eine Entmethylierung des letzteren erklären ließe.

---

[1]) W. Koch, Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 117.

IV.

Über einige Eigenschaften der freien Farbbasen und Farbsäuren.

Von Privatdozent Dr. **Leonor Michaelis.**

Aus der 1. medizinischen Klinik der königl. Charité in Berlin, Abteilung für Krebsforschung. (Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. E. v. Leyden.)

1.

Im allgemeinen wendet man sowohl in der industriellen wie in der histologischen Färbetechnik nicht die freien Farbbasen und Farbsäuren, sondern ihre Salze zum Färben an. In der Histologie ist wohl die Pikrinsäure so ziemlich die einzige in freiem Zustande gewöhnlich verwendete Farbsäure, während für Farbbasen kein einziges derartiges Beispiel existiert. Es hat nun von verschiedenen Seiten her ein Interesse, auch das Verhalten der freien Farbbasen und -Säuren gegenüber den verschiedenen Gewebselementen zu studieren. Einige Anfänge dazu sind schon gemacht worden.

Besonders geeignet für solche Versuche sind diejenigen Farbbasen und -Säuren, welche einen anderen Farbenton haben als ihre Salze. Beispiele dafür sind sehr zahlreich; doch ist hier Einschränkung am Platze, da die anderen bei der Tinktion in Betracht kommenden Manipulationen eine so große Variierung erheischen, daß die Untersuchungen sonst zu unübersichtlich werden. Aus verschiedenen, weiter unten zu erörternden Gründen wähle ich als Farbsäure die Säure des Eosins, als Farbbase die Base des Nilblau.

Es ist schon sehr lange bekannt, daß alle möglichen Gewebe, Seide, histologische Schnitte u. dgl. sich mit der farblosen Base des Fuchsins, dem Rosanilin, färben lassen, und zwar nicht farblos, sondern rot, als ob sich ein Salz bildete, dessen basische Komponente das Rosanilin, und dessen saure Komponente das

Gewebe darstellt. Und in der Tat sind derartige Versuche als Beweis dafür vorgebracht worden, daß die Färbung auf einer Salzbildung beruht. Der Grund, warum ich das Rosanilin nicht als Standardobjekt für eine Farbbase gewählt habe, ist der, daß alle Bindungen des freien Rosanilins, selbst diejenigen an stärkere Säuren, wie die Essigsäure, in der Kälte nicht plötzlich, sondern mit einer gewissen Trägheit eintreten. Es lag mir aber daran, um störende Nebenreaktionen, wie den Einfluß der Luft, zu vermeiden, möglichst schnell reagierende Stoffe zu gebrauchen.

In dieser Beziehung leisten die Thiazine (mit Ausnahme des Methylenblau, welches aus anderen Gründen ganz ungeeignet ist) bei weitem mehr. Besonders verwendbar ist das Niblau, welches für derartige Versuche von M. Heidenhain zuerst empfohlen wurde. Von den Farbsäuren wählte ich das Eosin deshalb, weil die freie Eosinsäure in Xylol löslich ist, und zwar farblos. Die Xylollösungen haben aber für meine Untersuchungen eine besondere Wichtigkeit. Das Kongorot und seine Verwandten (Benzopurpurin u. a.), welche M. Heidenhain für seine Versuche verwandt hat, schaltete ich aus meinen Versuchen aus, weil die freien Säuren dieser Farbstoffe nicht in Xylol und verwandten Solventien löslich sind.

Freie Farbbasen und Säuren kann man nun in verschiedenen Lösungsmitteln lösen und dadurch ihre Wirkungsweise stark modifizieren.

Zunächst ist da an die wässerigen Lösungen zu denken. Verhältnismäßig wenig freie Farbbasen und -Säuren lassen sich in eine echte wässerige Lösung bringen. Hierhin gehört vor allem die Pikrinsäure. Aber sonst sind die Beispiele knapp. Rosanilin ist etwas in Wasser löslich. Aber eine wirklich reine Rosanilinlösung ist sehr schwierig zu erhalten, weil sie aus der Luft mit großer Avidität Kohlensäure anzieht und sich dabei rötet. Und dann ist es bei den überhaupt nur langsam eintretenden geringen Färbungseffekten nicht sicher zu beurteilen, was auf Kosten des freien Rosanilins zu setzen ist, und was auf Kosten des Karbonats, welches sich natürlich einfach wie Fuchsin verhält. Dieser Bindung mit Kohlensäure kann man zwar dadurch vorbeugen, daß man etwas Alkali zu der Lösung hinzufügt; aber hierdurch werden, wie M. Heidenhain mit vollem Recht betont, die Bedingungen der Farbreaktion so erschwert, daß wiederum kein einwandfreier Schluß möglich ist. Meine Bemühungen gingen also dahin, eine wässerige Lösung der Nilblaubase zu erhalten.

2. Über die Löslichkeit der Farbbasen in Wasser und die koagulierende Wirkung des Lichtes.

Wie in zahlreichen Fällen, ist auch bei dem uns interessierenden Nilblau die freie Farbbase in Wasser unlöslich. Wenn man daher eine wässerige Lösung des blauen Nilblausulfats mit Natronlauge versetzt, so fällt die rubinrote Base aus. Je nach den Bedingungen fällt sie aber nicht immer gleich in flockiger Form aus, sondern kann als Suspension eine Lösung vortäuschen. Versetzt man eine sehr verdünnte Lösung von Nilblausulfat mit ein wenig Alkali, so tritt scheinbar nur ein Farbenumschlag ohne Fällung ein. Aber die ultramikroskopische Beobachtung lehrt, daß die rote Base sich nicht im Zustande echter Lösung befindet. Während nämlich die Salze des Nilblau im Ultramikroskop in wässeriger Lösung nichts von Struktur zeigen und nur den diffusen Lichtschein einer roten Fluoreszenz geben, zeigt sich die scheinbare Lösung der Base im Ultramikroskop zusammengesetzt aus zahllosen, schwebenden Teilchen, welche, wie ich an anderer Stelle auseinandergesetzt habe, nichts bedeuten als die Vorstufe der Ausflockung. Mit diesen Beobachtungen steht es im besten Einklang, wenn M. Heidenhain die Undiffundierbarkeit der Nilblaubase angibt.

Solche Suspensionen von eigentlich wasserunlöslichen Farbstoffen hat schon Ehrlich beobachtet in Form des Alizarinblauserums. Wenn sich im Organismus aus dem löslichen Alizarinweiß durch Oxydation unlösliches Alizarinblau bildet, so fällt es nicht aus, sondern bleibt als feinste, ultramikroskopische Suspension bestehen, als „Pseudolösung“, wie es Ehrlich damals nannte.

Die Ausflockung der Pseudolösungen der Farbbasen kann nun durch das Licht erheblich beschleunigt werden. Eine Pseudolösung der Nilblaubase kann sich im Dunkeln sehr lange unverändert halten. Im Sonnenlicht beginnt die Flockenbildung sehr rasch, und bald ist die zwischen oder über den Flocken befindliche Flüssigkeit völlig farblos. Diese koagulierende Wirkung des Lichtes, überhaupt eine Einwirkung des Lichtes auf den Suspensionszustand ist meines Wissens noch nicht beschrieben worden. Sie zeigt sich bei allen Thiazinen und Oxazinen.

Besonders interessant ist die Wirkung des Lichtes auf das Methylenazur und das Methylenblau. Es wird allgemein angegeben, und auch ich habe das getan, als ich die Aufmerksamkeit zum

ersten Male auf das Methylenazur*) lenkte, daß die Base des Methylenazurs eine rote Farbe habe und sich mit roter Farbe und schöner, roter Fluoreszenz in Chloroform löse. Ich kann jetzt hinzufügen, daß diese rote Farbe der wässerigen Pseudolösung erst unter der Einwirkung des Lichtes entsteht. Aus einer Lösung von reinem Methylenazur (Chlorhydrat) entsteht durch Natronlauge zunächst eine nur wenig veränderte, blaue oder eine blauviolette Farbe, welche sich im Dunkeln lange Zeit unverändert hält. Bringt man aber die wässerige, blauviolette Pseudolösung in das Sonnenlicht, so wird sie sichtlich von Sekunde zu Sekunde reiner rot. Schließlich, erst viel später, tritt die Ausflockung der Azurbase ein. Die Lichtwirkung ist um so rascher, je mehr NaOH die Lösung enthält.

Wenn man eine durch Sonnenlicht intensiv rot gewordene Azurbasenlösung durch Übersäuern mit Salzsäure wieder blau macht und dann wieder Natriumhydroxyd hinzufügt, so entsteht sofort die rein rote Farbe. Durch das Licht ist also nicht nur eine augenblickliche, sondern eine dauernde Veränderung der Methylenazurbase eingetreten. Dieses so veränderte Azur möchte ich als „Photazur" bezeichnen. Jedoch ist die Umwandlung des Azurs in Photazur keine tiefgreifende, irreversible chemische Veränderung, etwa eine Oxydation. Denn wenn man die rote Photazurbase durch Salzsäure in das blaue Chlorhydrat verwandelt und es durch Zusatz von JK als Jodhydrat abscheidet (oder auch durch bloßes Eindampfen ohne JK als Chlorhydrat wiedergewinnt), so hat man wieder gewöhnliches Azur, welches durch Alkalilauge nur blau bis blauviolett wird und erst durch Licht wieder in rotes Photazur verwandelt wird.

Das Methylenblau verhält sich noch anders. Eine in der Schicht eines Reagenzglases bis zur guten Durchsichtigkeit verdünnte Methylenblaulösung wird durch Natronlauge in seiner Nuance kaum geändert. Im Licht wird es rasch rot und gibt dann einen flockigen Niederschlag. Die Rotfärbung beruht aber in diesem Falle auf einer Oxydation, es bildet sich das Photazur,

*) Meine Untersuchungen über das Methylenazur haben zur Folge gehabt, daß aus der höchst unsicheren „Romanowskischen Reaktion" eine sichere Methode geworden ist. Ohne die theoretische Grundlage über das Methylenazur hätte diese Methode niemals diejenige Vollkommenheit erlangt, wie sie durch die „Giemsasche Lösung" heute geboten wird. Daß erst mit Hilfe dieser Methode die färberische Darstellung der Spirochaete pallida ermöglicht wurde, möge die Berechtigung derartiger farbchemischer Untersuchungen auch denjenigen erweisen, welche an sich diesen Untersuchungen kein Interesse abzugewinnen vermögen.

welches ein Oxydationsprodukt des Methylenblau ist. Durch Darstellung des Chlorhydrats oder Jodhydrats bekommt man einen Farbstoff von genau den Eigenschaften des gewöhnlichen Azurs: es gibt mit Alkali eine blaue bis blauviolette Base, die aber im Gegensatz zur Methylenblaubase durch Chloroform extrahierbar ist, und diese wandelt sich in Licht wieder in Photazur um. Das Methylenblau wird also durch das Licht in irreversibler Weise umgewandelt, das Methylenazur in reversibler Weise.

Bei der Oxydation des Methylenblau entstehen für gewöhnlich nach Bernthsen zwei Produkte, das Methylenviolett und das Methylenazur. Sie sind unter anderem daran zu unterscheiden, daß sich das Violett in konzentrierter Schwefelsäure mit violetter, das Azur mit grüner Farbe löst. Durch die Einwirkung des Lichtes auf stark verdünnte Methylenblaulösungen entsteht nicht Methylenviolett in nachweisbarer Menge, sondern nur Azur, bzw. Photazur.

Andere Thiazine, wie Thionin und Toluidinblau, welche sich durch Alkalizusatz gleich von vornherein rot färben, zeigen im Lichte nur die Erscheinung der beschleunigten Ausflockung, wie das Nilblau.

3. Die färberischen Eigenschaften der freien Farbbasen.

Wenn man eine wässerige Lösung des Nilblausulfats mit Natronlauge oder Ammoniak versetzt, so ist die unter Umständen in Pseudolösung bleibende Nilblaubase mit überschüssigem Alkali vermischt. Bei einem Färbeversuch mit einer solchen Lösung sind, wie auch M. Heidenhain hervorhebt*), die Bedingungen durch den ganz enormen Überschuß an Alkali so schlecht, daß fast niemals eine Färbung eintritt. Nur die Cellulose (reines Filtrierpapier) belädt sich selbst aus einer solchen Lösung mit Farbstoff. Wenn man diese Lösung nämlich auf Filtrierpapier tropft, so entsteht ein rotbrauner Fleck, aber um dieses Zentrum breitet sich der Rest der Flüssigkeit völlig farblos noch weiter aus. Es zerfließt also der gefärbte Tropfen nicht einfach auf dem Papier, sondern das Papier entreißt dem Tropfen vor seiner völligen Diffusion den gesamten Farbstoff, und zwar in der roten Nuance: es entsteht ein roter bis rotbrauner Fleck (welcher allerdings allmählich durch die Kohlensäure der Luft gebläut wird).

Diese Tatsache ist deshalb von ganz besonderem theoretischen Interesse, weil sie zeigt, daß die Adsorption der roten Nilblaubase

*) Pflügers Archiv 90, 182.

nicht unter allen Umständen mit einem Farbenumschlag nach Blau verbunden sein muß. Von den Elementen der tierischen Gewebe zeigt aber keines auch nur die Andeutung einer Affinität zur Nilblaubase in stark alkalischer Lösung. Anders steht es bei Zusatz geringer Mengen von Alkali, worüber ich auf die Untersuchungen von Bethe verweisen kann.

Ein allbekanntes Mittel, um organische Basen unter Vermeidung eines Alkaliüberschusses in wässeriger Lösung zu erhalten, ist die Behandlung der Salze mit frisch gefälltem, durch Dekantieren gewaschenem Silberoxyd. Auch M. Heidenhain hat diese Methode angewandt, um eine wässerige Lösung der Nilblaubase zu erhalten. Das geht ganz leicht; wenn man eine wässerige Nilblaulösung mit Silberoxyd schüttelt, so färbt sie sich rot, und nach dem Absetzen des Niederschlages stellt die rote Flüssigkeit eine reine Lösung der Nilblaubase dar.

Je nach der Konzentration des Nilblau und der Menge des angewandten Silberoxyds entsteht die Base in verschiedenem Zustande. Eine gesättigtere Nilblaulösung, mit reichlichem Silberoxyd geschüttelt, setzt das Silberoxyd und Chlorsilber sehr schwer ab, und wenn dies eingetreten ist, so ist auch gewöhnlich schon der Farbstoff mitgerissen und die Flüssigkeit farblos. Bei dünneren Lösungen und Verwendung von nicht zu viel Silberoxyd dagegen setzt sich das Silberoxyd nach dem Schütteln schnell ab, und die rote Base kann scheinbar völlig gelöst im Wasser zurückbleiben. Betrachtet man aber eine solche Lösung im Ultramikroskop, so erkennt man, daß die Base nicht wirklich gelöst ist, wie das Nilblausulfat, sondern nur in Form feiner Körnchen suspendiert, welche eine grünlich-gelbe Farbe haben. Es ist dieselbe Farbe, welche die durch Silberoxyd erhaltene Base in wässeriger Lösung mitunter in auffallendem Lichte zeigt, wie Heidenhain mitteilt. Heidenhain hält das für eine Fluoreszenzerscheinung; das ist es aber eigentlich nicht. Denn Fluoreszenzlicht ist nicht polarisiert, dieses gelbe Licht ist aber, wie man im Ultramikroskop leicht sehen kann, polarisiert. Es handelt sich also um einen ähnlichen Dichroismus, wie ihn das Goldrubinglas zeigt, welcher mit Fluoreszenz durchaus nicht verwechselt werden darf*). Die Erscheinung beruht

*) Eigentlich trifft auch „Dichroismus“ nicht völlig zu, weil man hierunter (allgemein „Pleochroismus“) die Eigenschaft nicht regulärer Kristalle versteht, in verschiedenen Kristallachsen verschiedenfarbiges Licht durchzulassen. Deshalb nennt Siedentopf (Physik. Zeitschr. 6, 24) die Erscheinung „Pseudopleochroismus“ oder „Pseudofluoreszenz“.

darauf, daß man im auffallenden Lichte das von den feinen, suspendierten Teilchen zerstreute Licht sieht, welches einigermaßen komplementär ist zu dem von den Teilchen durchgelassenen, bei durchfallender Beleuchtung sichtbaren Lichte. Das echte Fluoreszenzlicht ist niemals polarisiert und ist auch im Ultramikroskop nicht in Körnchen aufzulösen. Diese Pseudofluoreszenz hat also bei Farbstoffen dieselbe Bedeutung wie die Trübung bei farblosen wässerigen Lösungen; sie ist ein Ausdruck für die optische Inhomogenität der Flüssigkeit.

Mit diesen Beobachtungen steht in guter Übereinstimmung, daß nach einiger Zeit, mitunter erst nach länger als 24 Stunden, der gesamte Farbstoff der Nilblaubasenlösung sich flockig zu Boden senkt. Durch Schütteln ist der Farbstoff nicht wieder in Lösung zu bringen. Wir haben hier also das typische Verhalten einer irreversiblen kolloidalen Lösung vor uns, genau so, wie es nach der Beschreibung von Zsigmondy die kolloidale Goldlösung ist. Es ist sehr möglich, daß die Haltbarkeit der Nilblaubasenlösung in Wasser durch Verwendung von sehr reinem Wasser unter besonderen Kautelen ebenso erhöht werden kann wie die der kolloidalen Goldlösung nach Zsigmondy, doch habe ich das noch nicht näher untersucht.

Heidenhain gibt nun an, mit solchen roten Lösungen der Nilblaubase eine blaue „Anfärbung“ von Gewebsschnitten (in Alkohol fixierten Lymphdrüsen) erhalten zu haben. Er will damit beweisen, daß die Färbung eine chemische Reaktion, eine Salzbildung zwischen dem Nilblau als Base und dem Gewebe als Säure ist. So einfach, wie es nach dieser Beschreibung scheint, ist dieser Versuch aber gar nicht. Meist konnte ich an Schnitten, welche etwa eine Stunde in wässeriger Basenlösung standen, gar keine Färbung nachweisen, mitunter einen nur makroskopisch erkennbaren leichten rotbraunen Hauch, oder auch einen leichten bläulichen Hauch.

Heidenhain hat offenbar viel günstigere Basenlösungen erhalten, sie waren, wie mir scheint, konzentrierter und haltbarer als die meinigen. Deshalb ist ihm wohl die „Anfärbung“ geglückt. Ich muß diese Methode als eine höchst unsichere betrachten. Sie ist jedenfalls nicht zu vergleichen mit der sicheren, in wenigen Sekunden eintretenden Färbung, welche die Methode der Färbung aus Xylol liefert, die ich im nächsten Abschnitt beschreiben werde.

Wenn man die wässerige Basenlösung auf Filtrierpapier tupft oder besser, um die Wirkung der Kohlensäure auszuschalten, ein Stück Filtrierpapier in eine solche Lösung versenkt, so tritt eine geringe „Anfärbung“

des Papiers in schmutzig-blauem Farbenton ein. Auch hier ist die Reaktion viel geringer als mit den Xylollösungen.

Im Gegensatz hierzu sei noch einmal kurz die Reaktion von Gewebsschnitten (nach Alkohol-, Formalin- und Sublimatfixation) mit wässerigen Lösungen des Nilblausulfats (oder -Chlorids) skizziert. Diese Lösung ist zunächst einmal eine echte, selbst für das Ultramikroskop homogene Lösung; und die besonders in äußerst verdünnten Lösungen sichtbare rote Fluoreszenz ist wirklich eine solche; sie ist nicht polarisiert und ist im Ultramikroskop nur als diffuser, nicht auflösbarer Lichtkegel sichtbar. In Gewebsschnitten tritt selbst in den verdünntesten Lösungen vor allem eine intensive Färbung der Kerne ein; bei stärkeren Lösungen färbt sich auch Bindegewebe und Protoplasma mit; während aber die protoplasmatischen Substanzen die Farbe an Alkohol wieder leicht abgeben, ist die Kernfärbung gegen Alkohol fast absolut resistent.

Es gibt nun eine in Wasser besser lösliche Base, die Base des Methylenblau, welche man durch Schütteln einer wässerigen Methylenblaulösung mit Silberoxyd als blaue Lösung erhält. Zwar zeigt auch in dieser (durch Zentrifugieren vom Silberoxyd völlig befreiten) Lösung das Ultramikroskop zahllose Körnchen, welche in wässeriger Lösung der Salze des Methylenblau nicht vorhanden sind (zum größten Teil wohl AgCl-Körnchen), jedoch nimmt trotzdem die Methylenblaubase eine Ausnahmestelle ein, indem es gelingt, wässerige Lösungen von sehr hoher Konzentration und verhältnismäßig guter Beständigkeit zu erhalten. Lange hält diese Beständigkeit allerdings auch nicht an, weil sehr bald chemische Veränderungen beginnen, welche Bernthsen beschrieben hat. Eine solche wässerige Methylenblaubasenlösung verhält sich färberisch ebenso wie gewöhnliches Methylenblau, färbt also vor allem auch die Kerne in Schnitten. Es sind also wässeriges Methylenblau, wässerige Methylenblaubase, wässeriges Nilblau färberisch gleichartig; dagegen Nilblaubase in Xylol verhält sich anders. Methylenblaubase löst sich nicht in Xylol (nur die aus ihr allmählich entstehende Azurbase geht mit roter Farbe ins Xylol).

Ein Farbenumschlag tritt bei der Methylenblaubasenfärbung nicht ein, weil die Base auch blau ist.

Nun habe ich noch eine andere Anwendungsweise der Nilblaubase angegeben, indem man nämlich zur Färbung nicht die wässerige Pseudolösung, sondern die echte Lösung in Xylol

(Toluol, Chloroform u. dgl.) benutzt*). Diese Lösung hat eine gelbe bis rostbraune Farbe, je nach der Konzentration. Tupft man sie auf Filtrierpapier, so färbt sie dieses augenblicklich blau.

Den Einwand von M. Heidenhain, daß die Blaufärbung durch die Kohlensäure der Luft zustande komme, habe ich an anderer Stelle widerlegt, indem ich zeigte, daß selbst in einer reinen Wasserstoffatmosphäre dieselbe Reaktion eintritt, während unter denselben Bedingungen auf glasiertem Porzellan keine Blaufärbung eintritt; auch tritt die Blaufärbung sofort ein, wenn man das Papier tief in die Xylollösung hineinbringt und der Luft gar keinen Zutritt gewährt. Ebenso verhält sich aber auch ein Gewebsschnitt; in dem roten Nilblau-Xylol färbt er sich rasch blau.

Wenn man aber meint (und ich muß gestehen, daß ich anfänglich derselben Meinung zuneigte), daß hier dieselbe Färbung eingetreten sei wie aus der wässerigen Nilblausulfatlösung, und man könne aus der Färbung in Xylol einen Schluß über die Färbung im Wasser ziehen, so ist das ein Irrtum. Die in Xylol erreichte Färbung ist gar nicht dieselbe wie die in Wasser zustande gekommene. Erstens ist es keine Chromatinfärbung. Die Kerne erscheinen ungefärbt oder kaum gefärbt in der Mitte des dunkelblauen Protoplasmas. Zweitens wird die Xylolfärbung durch Alkohol rasch vollkommen extrahiert, ja sie wird sogar in Xylolbalsam extrahiert, und zwar mit blauer Farbe, während sie gegen reines Xylol und Zedernöl resistent ist. Da man auch durch wässerige Nilblausulfatlösung außer der Kernfärbung eine Protoplasmafärbung erhält, so legte ich mir die Frage vor, ob diese in ihrem Wesen identisch sei mit der Nilblauxylolfärbung. Ich konnte feststellen, daß das nicht der Fall ist. Die in wässeriger Lösung erhaltene Färbung wird nämlich nicht durch Xylolbalsam extrahiert.

Um dies festzustellen, wurden die in wässeriger Lösung gefärbten Schnitte mit Wasser abgespült, mit Fließpapier und an der Luft getrocknet und unter Vermeidung von allem Alkohol direkt in Xylolbalsam gebracht.

Die Deutung dieser Divergenz der beiden entsprechenden Färbungen ist offenbar die, daß bei wässeriger Färbung das Nilblausulfat als Ganzes vom Gewebe absorbiert wird, bei Xylolfärbung dagegen bloß die Nilblaubase.

Nun kann man aber auch Salze der Nilblaubase in Xylol zur Lösung bringen. Wenn man die gelbe Nilblaubasenxylollösung mit

*) Diese Lösung wird in folgender Weise hergestellt: Eine wässerige (etwa $^1/_2$ proz.) Lösung von Nilblau wird mit etwas NaOH versetzt und mit Xylol durchgeschüttelt. Das sich oben absetzende Xylol enthält dann die Nilblaubase gelöst.

reichlich Eisessig versetzt, so färbt sie sich blau mit starker roter Fluoreszenz. Das Ultramikroskop zeigt nur eine diffuse, unpolarisierte Fluoreszenz. Diese Lösung färbt Schnitte ebenso wie die freie Base. Auch hier tritt keine Kernfärbung ein.

In dieser Weise verhalten sich gegen Nilblauxylol Paraffinschnitte von in Alkohol, Formalin oder Sublimat fixierten Organen (Niere, Leber, Milz, Lymphdrüse), wenn die Schnitte ganz frisch nach dem Antrocknen auf dem Objektträger (mit Eiweißglycerin oder mit 30 proz. Spiritus) zur Färbung benutzt werden. Bewahrt man die aufgeklebten, noch paraffinhaltigen Schnitte mehrere Tage auf, so verlieren sie allmählich ihre Affinität zum Nilblauxylol vollkommen. Bei 40° verlieren die aufgeklebten Schnitte die Färbbarkeit schon fast völlig nach 12 Stunden. Die Ursache muß in dem Verdunsten der letzten Spuren des dem Gewebe noch anhaftenden Wassers liegen, denn bringt man die unfärbbar gewordenen Schnitte (durch Xylol, Alkohol) für einige Sekunden in Wasser und färbt sie dann (nach Behandlung mit Alkohol, Xylol) mit Nilblauxylol, so nehmen sie die Farbe wiederum intensiv an. Dies stimmt damit überein, daß Schnitte, welche durch Xylolnilblau unfärbbar geworden sind, ihre Färbbarkeit in wässerigem Nilblausulfat noch völlig erhalten haben.

Das Wesentliche dieser Beobachtungen ist also folgendes:

1. Aus wässeriger, wirklicher Lösung färben die basischen Farbstoffe sowohl in Form der freien Base (Beispiel: Methylenblaubase in Wasser), als auch in Form der Salze (Beispiel: gewöhnliches wässeriges Methylenblau oder Nilblau) besonders die Kerne.

2. Aus Xylollösung färben die basischen Farbstoffe weder in Form der freien Farbbasen (Beispiel: Nilblauxylol) noch in Form der Salze (Beispiel: Nilblauacetat in Xylol) die Kerne.

3. Es kann auch eine Protoplasmafärbung durch basische Farbstoffe erreicht werden, welche aber sehr wenig alkoholresistent ist. Die durch wässerige Lösungen der Farbsalze hervorgerufene Protoplasmafärbung ist nicht identisch mit der durch Xylollösung der Farbbasen hervorgerufenen Protoplasmafärbung; erstere läßt sich nicht durch Kanadabalsam extrahieren, wohl aber letztere.

Hinzufügen möchte ich zur Ergänzung noch, daß aus alkoholischen Lösungen das Nilblau in jeder Form nur eine minimale Färbekraft hat, was sich mit den alten Erfahrungen völlig deckt.

Abstrichpräparate verhalten sich gegen Nilblauxylol ganz anders als Schnitte. Ein frisches, lufttrockenes, kurz in Alkohol fixiertes Blutpräparat ist in Nilblauxylol völlig unfärbbar. Nicht einmal die so sehr

basophilen Granulationen der Mastzellen in leukämischem Blut nehmen auch nur eine Spur Farbe an. Das ist um so bedeutsamer, als Abstrichpräparate sich in Eosinxylol augenblicklich intensiv färben, worauf ich noch zurückkommen werde. Ein im feuchten Zustande in Alkohol absolutus fixiertes Blutpräparat verhält sich fast ebenso, nur nehmen in dicken Stellen des Präparates die roten Blutkörperchen eine ganz geringfügige Blaufärbung an, die fast nur makroskopisch zu erkennen ist. Dagegen ist ein noch feucht in konzentrierter wässeriger Sublimatlösung fixiertes, dann kurz mit Alkohol entwässertes Blutpräparat mit Xylolnilblau gut färbbar, und zwar nehmen hier nicht nur die protoplasmatischen Substanzen und die roten Blutkörperchen die Farbe an, sondern auch die Kerne der Leukocyten. Das ist bisher der einzige Fall, in dem ich mit Nilblauxylol eine Kernfärbung erhalten konnte.

4. Die färberischen Eigenschaften der Eosinsäure.

Das Verhalten der Farbsäuren ist viel einfacher als das der Basen. Die Herstellung der Lösung geschieht in der Weise, daß eine (etwa ½ proz.) wässerige Lösung von Eosin mit wenigen Tropfen Salzsäure versetzt wird. Es entsteht dabei ein flockiger, gelber Niederschlag von Eosinsäure, welcher sich in Xylol ausschütteln läßt. Diese Xylollösung ist farblos.

In Chloroform dagegen löst sich die Eosinsäure mit gelber Farbe. Diese Chloroformlösung des Jodeosin wurde von Mylius benutzt, um Alkali im Glase nachzuweisen, indem sie mit Alkali einen roten Fleck gibt. Ehrlich benutzte dieselbe Lösung, um in getrockneten, unfixierten Blutpräparaten den Ort der Alkalinität nachzuweisen. Auf Grund der seit jenen Untersuchungen hinzugewonnenen Erfahrungen wäre es eine dankenswerte Aufgabe, diese Methode Ehrlichs einer erneuten Untersuchung zu unterziehen. Hier will ich diese Frage jedoch ausschalten.

Im fixierten Präparat, gleichgültig, ob Paraffinschnitt oder Trockenpräparat, verhält sich die farblose Eosinsäurexylollösung im ganzen ebenso wie eine wässerige Eosinlösung; sie bewirkt augenblicklich eine diffuse Rotfärbung, wie sie auch auf Filtrierpapier augenblicklich einen roten Fleck hervorruft. Bei längerer Aufbewahrung der auf dem Objektträger aufgeklebten Schnitte geht auch die Färbbarkeit mit Eosinxylol allmählich verloren, aber später als die Färbbarkeit mit Nilblauxylol. Durch Einwirkung des Wassers in der beim Nilblauxylol beschriebenen Weise wird die Färbbarkeit in Eosinxylol wiederhergestellt.

Der Unterschied der in Eosinxylol gefärbten Präparate von den in wässeriger Eosinlösung gefärbten Präparaten besteht in einer noch größeren Diffusität der Xylolpräparate. Im Bindegewebe heben sich die Fasern gegen die Grundsubstanz weniger ab, bei Blutpräparaten treten die eosinophilen Granulationen infolge starker Protoplasmafärbung minder scharf hervor als bei wässeriger Eosinfärbung.

Kanadabalsam extrahiert die Eosinxylolfärbung nicht, im Gegensatz zur Nilblauxylolfärbung. Deshalb ist auch die Eosinxylolfärbung eine sehr bequeme Methode der Eosinnachfärbung nach beendeter Hämatoxylinfärbung. Die Schnitte kommen erst aus dem letzten Xylol in die Eosinxylollösung, werden dann noch einmal kurz mit Xylol abgespült und in Kanadabalsam eingeschlossen. Bei wenig intensiver Eosinfärbung geschieht es manchmal aus unerklärlichen Gründen, daß die Eosinfärbung in 24 Stunden völlig verblaßt. Dann verwerfe man die Eosinxylollösung und bereite sie neu. Nach dieser, in seltenen Fällen zu beobachtenden ersten Verblassungsfrist habe ich weiter keine Veränderung an den Präparaten bemerkt.

5. Anwendung der beobachteten Tatsachen auf die Theorie des Färbeprozesses.

Aus den mitgeteilten Befunden möchte ich für die Auffassung des Färbeprozesses folgende allgemeine Schlüsse ziehen:

1. Zum Zustandekommen der Gewebefärbung ist die Gegenwart von Wasser notwendig.

2. Protoplasmatische Substanzen enthalten auch noch im Zustande der Paraffinschnitte genügend Wasser, um sich sowohl mit Farbbasen wie mit Farbsäuren zu färben, welche selbst in wasserfreien Medien gelöst sind; sie verlieren das Wasser, wenn sie in Form der Paraffinschnitte längere Zeit aufbewahrt werden, nehmen es aber sehr leicht wieder an, wenn sie wieder mit Wasser benetzt (und dann wieder „entwässert“) werden.

3. Das Chromatin dagegen enthält im Zustande der Paraffinschnitte nicht mehr das zur Färbung nötige Wasser.

4. Getrocknete, mit Alkohol fixierte Abstrichpräparate färben sich bei Abwesenheit von Wasser wohl noch mit Farbsäuren, aber nicht mehr mit Farbbasen.

5. Die wässerigen Pseudolösungen der Farbbasen sind trotz der Gegenwart des Wassers nicht oder kaum zur Färbung befähigt.

Die letztere Tatsache scheint in einem gewissen Widerspruch mit einer früher von mir mitgeteilten Beobachtung zu stehen. Ich hatte nämlich als Regel aufgestellt, daß diejenigen Farbstoffe eine besonders hohe, diffuse Färbekraft besitzen, die sich ultramikroskopisch in wässeriger Lösung nur zum Teil gelöst, zum anderen Teil suspendiert erweisen. Dieser Widerspruch ist nur scheinbar; denn nichts spricht dafür, daß bei solchen Farbstoffen die Färbekraft an den suspendierten Anteil gebunden sei; es steht nichts der Annahme im Wege, daß auch bei diesen Farbstoffen der wirklich gelöste Anteil des Farbstoffes die Färbung hervorruft.

Beides, sowohl die diffuse Färbekraft, wie das Auftreten der partiellen ultramikroskopischen Suspension, sind nur der Ausdruck eines und desselben Prinzips: des Umstandes, daß diese Farbstoffe mit ganz besonderer Leichtigkeit ihrer wässerigen Lösung entrissen werden können.

Literatur.

Ehrlich, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885.

M. Heidenhain, Pflügers Archiv **90**, 115; **96**, 440; **100**, 217; Zeitschr. f. wiss. Mikr. **19**, 431, 1902.

L. Michaelis, Pflügers Archiv **97**, 634; ebenda **101**, 183. Zentralbl. f. norm. u. path. Anat. I, Heft 3. Virchows Archiv **179**, 1905, 195.

Bethe, Hofmeisters Beiträge **6**, 399.

V.

Über die Rolle des Pankreas bei der Verdauung und Resorption der Kohlehydrate.

Von Dr. **Ugo Lombroso.**

Aus dem Institut für allgemeine Pathologie in Turin.
(Vorstand: Prof. Dr. R. Morpurgo).

---

1. Vorbemerkungen.

Bekanntlich spielt die äußere Sekretion des Pankreas bei der Vorbereitung der Nährstoffe für die Resorption (der Proteo-, Amylo-, Lipolyse) eine sehr wichtige Rolle. Es lag daher nahe, das Auftreten schwerer Störungen in der Ausnutzung der Nahrung nach der Pankreasexstirpation dem Ausfall der betreffenden Enzymwirkungen zuzuschreiben. Demgegenüber habe ich[1]) aber beobachtet, daß die Unterbindung und Resektion der Pankreasausführungsgänge beim Hunde an sich nicht die schweren Resorptionsstörungen bewirkt, die man nach der Exstirpation des Pankreas beobachtet, daß diese Störungen aber sofort eintreten, sobald man der Ligatur der Ausführungsgänge die Exstirpation folgen läßt.

Nun könnte man zur Erklärung dieses ungleichen Verhaltens daran denken, daß der Verschluß der Ausführungsgänge die Bildung des Sekrets in der Drüse nicht berührt und daß das Sekret auf einem anderen als dem normalen Wege an seinen Bestimmungsort gelangt. Eine solche Annahme wäre nicht ganz neu. Daß die Struktur des Hodens nach Unterbindung und Resektion des Samenleiters noch lange Zeit normal bleibt, hat man versucht, durch die Annahme zu erklären, daß die Drüse weiter funktioniert und ihr

---

[1]) U. Lombroso, Giornale della R. Accademia di Medicina. Torino, 10. März 1903. Daß die Unterbindung des Ductus Wirsungianus keine besonderen Störungen in der Nahrungsresorption nach sich zieht, ist mehrfach beobachtet. Doch hat man dies später aus dem Funktionieren des zweiten Ausführungsganges erklärt. Vgl. U. Lombroso, Archivio delle Scienze Mediche, Torino 1904.

Sekret auf anderem Wege abgibt[1]). Ferner weiß man, daß bei behindertem Gallenabfluß eine Rückresorption erfolgt und Gallenbestandteile durch andere Drüsen, unter denen sich auch solche des Verdauungstraktes befinden, zur Ausscheidung kommen. Übrigens ist eine ähnliche Vorstellung in einem dem vorliegenden ähnlichen Falle bereits ausgesprochen worden. Abelmann[2]) beobachtete, daß die Fette nach partieller Exstirpation des Pankreas sehr viel besser ausgenutzt wurden als nach gänzlicher Entfernung, obgleich auch im ersteren Falle der Zufluß von Pankreassaft zum Darm ausgeschlossen war. „Man muß annehmen, daß in diesen Fällen das wirksame Agens auf irgend einem anderen Wege in den Darm gelangte, — vielleicht durch eine vikarierende Ausscheidung desselben in den anderen Darmsekreten."

Die Tatsache, daß das Pankreas nach doppelter Ductusligatur seine normale Struktur behält, somit anscheinend sein Sekret weitererzeugt, ließe sich mit einer solchen Deutung gut vereinigen. Wohl aber widerspricht ihr der von mir geführte Nachweis, daß Hunde mit nach Pawlow angelegter Pankreas-Dauerfistel keine besonderen Resorptionsstörungen aufweisen, obgleich bei ihnen das gesamte Sekret nach außen abfließt, daß aber bei ihnen solche Störungen nach kurzer Zeit auftreten, wenn man nachträglich das Pankreas exstirpiert[3]).

2. Hat die Unterbindung der Ausführungsgänge oder die Exstirpation des Pankreas einen Einfluß auf die diastatische Wirkung der Verdauungssekrete?

Dem Pankreas muß sonach neben seiner bekannten sekretorischen Leistung noch eine andere davon unabhängige Funktion für die Resorption der Nährstoffe zukommen. Die nächstliegende Vermutung über die Natur dieser unbekannten Funktion schien mir die zu sein, daß das Pankreas, auch wenn es kein Sekret in den Darm ergießen kann, doch indirekt die fermentativen Vorgänge darin beeinflußt. Damit würde eine der äußeren Sekretion des Pankreas anerkanntermaßen zukommende Rolle auch für diese sonst unbekannte Funktion in Anspruch genommen, ohne dabei der gesicherten Annahme nahezutreten, daß die Nährstoffresorption von der Intensität der fermentativen Prozesse abhängt.

[1]) J. Fabris, Arch. delle Scienze Med., Torino 1903.

[2]) Abelmann, Diss., Dorpat 1890, S. 64.

[3]) U. Lombroso u. E. Sampietro, Giornale d. R. Accad. di Medic., Torino 1903; U. Lombroso, Ebenda 1905.

Ich habe es demzufolge unternommen, festzustellen, ob die Unterbindung und Resektion der Pankreasausführungsgänge einen Einfluß auf die Wirkung der sonst in den Darm sich ergießenden Sekrete ausübt.

Im nachstehenden berichte ich über meine einschlägigen Versuche, soweit sie sich auf die Resorption der Kohlenhydrate und die Amylolyse beziehen[1]).

Von der Tatsache ausgehend, daß die Verdauung der Stärke, wenn das Pankreassekret ausgeschaltet ist, nur von der Leistung der Fermente des Speichels und des Darmsaftes abhängt, habe ich vor allem die amylolytische Wirkung dieser beiden Sekrete bei Hunden ins Auge gefaßt. Dabei ergab sich hier die Leistung des Speichels als sehr gering, während sich jene des Darmsaftes als sehr erheblich herausstellte.

Bei meinen Versuchen mit Darmsaft sammelte ich das Sekret aus einer Vellaschen Fistel während der Verdauung, oder nach subcutaner Injektion von Pilocarpin (2 mg in 1 ccm Wasser), oder nach direkter Einführung von Pilocarpin in die Darmschlinge. Letzteres Vorgehen lieferte in 15 bis 20 Minuten 2 bis 5 ccm Sekret, während es viel mehr Zeit brauchte, um dasselbe Quantum während der Verdauung zu gewinnen. Ich habe es daher vorwiegend benutzt, mich aber vorher überzeugt, daß die Qualität und Quantität des Sekrets der Art war, daß die erhaltenen Resultate meinem Zwecke entsprechen konnten.

2 ccm des Sekrets wurden mit 1 g in 30 ccm Wasser gekochter Weizenstärke gemischt, mit Thymol versetzt und sechs Stunden bei 40° im Thermostaten gehalten. Den entstandenen Zucker bestimmte ich mit Fehlingscher Lösung. An jedem Versuchshunde führte ich zahlreiche Bestimmungen aus, und zwar bei verschiedenem Ernährungs- und Erregungszustande.

Ich führe im folgenden die Ergebnisse von einigen dieser Versuche kurz an. Die übrigen führten zu ganz analogen Resultaten.

Versuch 1. Hund, 8,6 kg schwer.

2\. Okt. 1904. Vellasche Fistel angelegt.

14\. Okt. 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Während der Verdauung wird das Sekret gesammelt. — Nach sechs Stunden haben sich 0,097 g Zucker gebildet.

---

[1]) Den Einfluß des Pankreas auf die Resorption und Spaltung der Fette habe ich an anderer Stelle besprochen. Eine Zusammenfassung meiner Versuche findet sich in den Archives italiennes de biologie 1904. Torino. Meine einschlägigen Versuche über Resorption des Eiweißes und die Proteolyse werde ich, da inzwischen Arbeiten erschienen sind, deren Resultate nicht ganz mit meinen übereinstimmen, später veröffentlichen.

16. Okt. 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später werden 2 mg Pilocarpin in die Vellasche Schlinge eingespritzt und das Sekret gesammelt. Nach sechs Stunden haben sich 0,11 g Zucker gebildet.
21. Okt. 1904. Unterbindung und Durchschneidung der zwei Ausführungsgänge.
27. Okt. 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Sekret während der Verdauung gesammelt. In sechs Stunden bilden sich 0,092 g Zucker.
29. Okt. 1904. 200 g Fleisch und 100 g Brot. Drei Stunden danach 2 mg Pilocarpin in die Schlinge eingespritzt. In sechs Stunden bilden sich 0,112 g Zucker.

Versuch 2. Hund, 6,9 kg schwer.

21. Nov. 1904. Vellasche Fistel angelegt.
29. Nov. 1904. Fütterung mit 100 g Fleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später Pilocarpineinspritzung. In sechs Stunden 0,08 g Zucker.
6. Dez. 1904. Unterbindung und Durchschneidung der zwei Ausführungsgänge des Pankreas.
10. Dez. 1904. Fütterung. Drei Stunden später Pilocarpineinspritzung. Nach sechs Stunden 0,092 g Zucker.

Versuch 3. Hündin, 7,2 kg schwer.

20. Sept. 1904. Vellasche Fistel.
29. Sept. 1904. Fütterung mit 200 ccm Milch und 100 g Brot. Drei Stunden später Pilocarpineinspritzung. Nach sechs Stunden 0,06 g Zucker.
18. Okt. 1904. Unterbindung und Durchschneidung der zwei Bauchspeicheldrüsengänge.
23. Okt. 1904. Fütterung mit 200 ccm Milch und 100 g Brot. Drei Stunden später Pilocarpineinspritzung. In sechs Stunden 0,068 g Zucker.

Versuch 4. Hündin, 8,4 kg schwer.

24. April 1905. Vellasche Fistel.
7. Mai 1905. Fütterung mit 200 g Fleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später Pilocarpineinspritzung. In sechs Stunden 0,148 g Zucker.
12. Mai 1905. Unterbindung und Durchschneidung der zwei Pankreasgänge.
19. Mai 1905. Fütterung mit 200 g Fleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später Pilocarpineinspritzung. In sechs Stunden 0,125 g Zucker.

Versuch 5. Hündin, 7,7 kg schwer.

16. Okt. 1904. Vellasche Fistel.
28. Okt. 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Sammlung des Sekrets. In sechs Stunden 0,18 g Zucker.
29. Oktober 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. In sechs Stunden 0,19 g Zucker.
4. November 1904. Unterbindung und Durchschneidung der zwei Pankreasgänge.
11. November 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Sammlung des Sekretes. In sechs Stunden 0,14 g Zucker.

13. November 1904. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. In sechs Stunden 0,168 g Zucker.

Versuch 6. Hündin, 8,0 kg schwer.

6. Dezember 1904. Vellasche Fistel.
18. „ „ Fütterung mit 300 ccm Milch und 100 g Brot. Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. In sechs Stunden 0,11 g Zucker.
20. Dezember 1904. Unterbindung und Durchschneidung der zwei Gänge.
28. „ „ Fütterung mit 300 ccm Milch und 100 g Brot. Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. In sechs Stunden 0,1130 g Zucker.
16. Januar 1905. Während der anhaltenden Chloroformierung behufs Pankreasexstirpation stirbt das Tier. Es wird die Gallenblase herausgenommen und die Wirksamkeit der Galle in bezug auf Zuckerbildung in der gewöhnlichen Weise untersucht. Zucker: nach sechs Stunden Spuren; nach 12 Stunden nicht bestimmbare Spuren.

Ich muß hier bemerken, daß ich bei demselben Tiere und unter sonst gleichen Bedingungen, je nach den verfütterten Nährsubstanzen, Schwankungen in der Wirksamkeit des Darmsaftes gefunden habe. Das Pilocarpinsekret erwies sich als etwas wirksamer als das natürliche.

Aus der Gesamtheit dieser Beobachtungen kann man folgern, daß, wenn durch die Unterbindung und Durchschneidung der Bauchspeicheldrüsengänge der Ausfluß des Pankreassekretes aufgehoben ist, das Fehlen der amylolytischen Wirkung des Pankreassekretes nicht dadurch kompensiert wird, daß ein anderes Sekret, das sich in den Darm ergießt, diastatisch wirksamer wird oder überhaupt erst diastatische Eigenschaften annimmt.

Durch diese Beobachtung gewinnt die Tatsache erhöhtes Interesse, daß sich trotzdem bei den so operierten Tieren die Resorption der Kohlehydrate normal oder fast normal verhielt. Das deutet darauf hin, daß sie von Faktoren beeinflußt wird, welche vollständig von den im Verdauungskanal vor sich gehenden enzymatischen Vorgängen unabhängig sind.

Obwohl die oben erwähnten Untersuchungen ergeben hatten, daß, im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, die nach der Exstirpation des Pankreas beobachteten Störungen nicht ausschließlich dem Fehlen der Pankreasfermente im Verdauungskanal zuzuschreiben sind, habe ich es daraufhin für nötig gehalten, mich neuerlich direkt zu überzeugen, ob etwa unter den Störungen, welche nach der Pankreasexstirpation eintreten, auch eine Abnahme der Fermentwirkung der übrigen Sekrete, die sich in den Verdauungskanal

ergießen, festzustellen wäre. Ich habe bei den oben erwähnten Hunden mit Vellascher Fistel und unterbundenen Bauchspeicheldrüsengängen nachträglich die Exstirpation ausgeführt und bei dreien dieser Hunde, welche danach (14, 19, 29 Tage) am Leben blieben, in der oben geschilderten Weise die amylolytische Wirksamkeit des Darmsaftes untersucht.

Versuch 7. Hündin (s. Vers. 5).

27. November 1904. Exstirpation der Bauchspeicheldrüse.

28. „ „ Fütterung mit 200 g Fleisch (das Tier weist das Brot zurück). Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. Sammlung des Sekretes; in sechs Stunden 0,28 g Zucker.

8. Dezember 1904. Der Hund stirbt. Es wird die Galle gesammelt und in der gewöhnlichen Weise auf ihre amylolytische Wirkung geprüft. Nach sechs Stunden 0,04 g Zucker; nach 12 Stunden 0,09 g Zucker.

Versuch 8. Hündin (s. Vers. 3).

2. November 1904. Exstirpation der Bauchspeicheldrüse. Fütterung mit 200 g Pferdefleisch und 100 g Brot. Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. Sammlung des Sekretes; in sechs Stunden 0,22 g Zucker.
Fütterung mit 200 g Fleisch und 300 ccm Milch. Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. Sammlung des Sekretes; in sechs Stunden 0,20 g Zucker.

20. November 1904. Der Hund stirbt.

Versuch 9. Hündin (s. Vers. 4).

6. Juni 1905. Exstirpation der Bauchspeicheldrüse.

11. „ „ Fütterung mit 100 g Pferdefleisch (das Tier weist Brot zurück und frißt auch das Fleisch nur mit Unlust). Drei Stunden später Einführung des Pilocarpins in die Schlinge. Sammlung des Sekretes; in sechs Stunden 0,206 g Zucker.

14. Juni 1905. Fütterung mit rohen Eiern (das Tier weist Brot und Fleisch zurück). Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. Sammlung des Sekretes; in sechs Stunden 0,112 g Zucker.

16. Juni 1905. Fütterung mit 400 g gekochten Kartoffeln und vier Eiern (das Tier weist Brot und Fleisch zurück). Drei Stunden später Einführung von Pilocarpin in die Schlinge. Sammlung des Sekretes; in sechs Stunden 0,1600 g Zucker.

28. Juni 1905. Fütterung mit 200 g Kartoffeln und 100 g Pferdefleisch. Pilocarpinsekret; in sechs Stunden 0,230 g Zucker.

4. Juli 1905. Das Tier stirbt, nachdem es vier Tage lang jede Nahrung zurückgewiesen hat. Die sehr zähe Galle wird in zwei Teile geteilt und auf diastatische Wirkung geprüft. In sechs Stunden: Zucker nicht dosierbar; in 12 Stunden 0,046 g.

Das erhaltene Darmsekret war im allgemeinen sehr dickflüssig. Außerdem bedingte öfter (besonders bei Versuch 3) die Einführung des Pilocarpins

die Ausstoßung einer kompakten, weißgelblichen, strangförmigen Masse, welche wenigstens zum Teil aus eingedicktem Sekret bestand, da sie sich als stark amylolytisch erwies. Bezüglich der Galle glaube ich, daß der gefundene Zucker auf ihre amylolytische Wirksamkeit zurückzuführen ist, denn als ich in einigen Fällen den Zucker nach einer kürzeren Zeit der Einwirkung (drei bis vier Stunden) bestimmte, fand ich seine Menge geringer.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, wenn man zunächst die Zunahme der amylolytischen Wirkung des Darmsaftes beim Tier ohne Pankreas nicht berücksichtigt, daß zwischen den Hunden mit unterbundenen Bauchspeicheldrüsengängen vor und nach Exstirpation des Pankreas kein Unterschied in der fermentativen Leistung des Verdauungskanals besteht, der geeignet wäre, die Ungleichheit in der Resorption der Kohlehydrate zu erklären. Das weist darauf hin, daß, wie schon oben gesagt, die Verdauung und Resorption der Nährstoffe durch Faktoren beeinflußt werden kann, welche von der enzymatischen Wirksamkeit der sich in den Verdauungskanal ergießenden Sekrete unabhängig sind.

3. Schlußfolgerungen.

Aus den berichteten Versuchen geht folgendes hervor: Durch die Unterbindung und Durchschneidung der Pankreasausführungsgänge wird beim Hunde keine unzweideutige Zunahme der amylolytischen Wirkung anderer in den Verdauungskanal sich ergießender Sekrete veranlaßt. Die normale oder nahezu normale Resorption der Kohlehydrate nach Wegfall des Pankreassekretes kann sonach in solchen Fällen nicht durch Zunahme der amylolytischen Wirkung anderer Sekrete erklärt werden.

Die schwere Störung der Kohlehydratresorption, welche bei Tieren mit unterbundenen Ductus infolge von Pankreasexstirpation auftritt, kann aber auch nicht einer Verminderung der amylolytischen Wirksamkeit der Darmsekrete (welche ich in zwei Fällen beobachtete) zugeschrieben werden; man muß deshalb dem Pankreas neben der sekretorischen eine weitere Funktion zuschreiben, welche zum Zustandekommen der Resorption der Kohlehydrate nötig ist, und welche diese unabhängig von den im Verdauungskanal vor sich gehenden fermentativen Prozessen beeinflußt.

Die nach Pankreasexstirpation beobachteten Erscheinungen, wie Glykosurie, Glykämie usw., welche dem Fehlen der inneren Sekretion des Pankreas zugeschrieben werden, fehlen bei Tieren nach Unterbindung und Durchschneidung der Bauchspeicheldrüsen-

gänge. Aber es sind hier andere beobachtet worden: Lépine[1]) will z. B. eine bedeutende Zunahme der glykolytischen Wirksamkeit des Blutes beobachtet haben, Hédon[2]) eine rasche Abmagerung des Tieres trotz der guten Resorption usw.

Nach meinen Erfahrungen dürfte, wenn ich eine Meinung äußern darf, ehe ich meine Untersuchungen über diesen Gegenstand abgeschlossen habe, die Unterbindung der Pankreasgänge physiologische Bedingungen setzen, welche, wenn auch nur indirekt, der Nährstoffresorption so günstig sind, daß sie selbst bei geringerer Leistung der Enzyme im Verdauungskanal ausreicht, wogegen das Fehlen des Pankreas anscheinend in ähnlicher indirekter Art die Verdauung und Resorption der Kohlehydrate trotz relativ günstiger Enzymleistung beeinträchtigt.

---

[1]) Lépine, Archives de méd. expérim. 1899. Journal de physiologie et pathologie générale 1905.

[2]) Hédon, Archives de méd. expérim. 1892.

Kürzere Mitteilungen.

1. Zur Frage der Kreatin- und der Kreatininausscheidung beim Menschen.

Von **Kj. Otto af Klercker.**

Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Lund.

Vorläufige Mitteilung.

Im vorigen Jahre beschrieb Folin [1]) eine kolorimetrische Methode, wodurch es möglich wurde, die quantitative Bestimmung sowohl von Kreatinin als Kreatin im Harn schnell und bequem auszuführen. Es schien mir eine dankbare Aufgabe zu sein, mit dieser allem Anschein nach so einfachen Methode die Frage über die Ausscheidung der Fleischbasen bei verschiedenen Krankheiten und pathologischen Zuständen zu erledigen. Hierüber liegen sehr wenige Untersuchungen vor, was auch angesichts der Schwierigkeiten, die der früher verwendeten Neubauerschen Methode anhaften, nicht zu verwundern ist. Diese ist für die Klinik viel zu umständlich und zeitraubend und außerdem nicht einmal ganz zuverlässig. Ehe ich mich indessen mit den pathologischen Zuständen beschäftigen konnte, schien es mir, besonders auf Grund dieser Unzuverlässigkeit der älteren Methode, notwendig, zuerst die Aufmerksamkeit den physiologischen Verhältnissen zu widmen. Nachdem ich mich von der Zuverlässigkeit der neuen Methode überzeugt hatte, habe ich daher eine Reihe von Untersuchungen an mir selbst begonnen, die ich so bald als möglich weiter zu führen beabsichtige. Ich sehe mich aber schon jetzt veranlaßt, einen kurzen Bericht über die wichtigsten Resultate zu erstatten, die ich bereits gewonnen zu haben glaube, besonders mit Rücksicht auf einige gerade jetzt zu meiner Kenntnis gekommene, von Pekelharing publizierte Untersuchungen aus dem physiologischen Laboratorium zu Utrecht [2]), die die meinigen teilweise berühren.

Als Muttersubstanz des mit dem Harn ausgeschiedenen Kreatinins wird, wie bekannt, allgemein das Kreatin betrachtet, das einerseits in den Muskeln des eigenen Organismus gebildet, andererseits mit der Nahrung, besonders dem Fleisch, von außen eingeführt wird. Nach

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 223, 1904.

[2]) Onderzoekingen', gedaan in het physiologisch laboratorium der Utrechtsche Hoogeschool, vijfde Reeks VI, 2, S. 210. Utrecht 1905.

Folin ist die Größe der Kreatininausscheidung bei kreatinfreier Nahrung ziemlich konstant und ganz und gar unabhängig von noch so großen Variationen des Eiweißgehalts der Nahrung. Er meint darum, daß die Kreatininbildung im Organismus ein Ausdruck für eine spezifische Art des Zerfalles des Organeiweißes ist, im Gegensatz zu derjenigen des Nahrungseiweißes, bei der Harnstoff gebildet wird. Wir haben mit anderen Worten zwei verschiedene Arten des Eiweißstoffwechsels zu unterscheiden, von denen die eine, der endogene oder Gewebseiweißstoffwechsel, relativ konstant ist und als Stoffwechselprodukt unter anderem Kreatinin liefert, die andere Art, der exogene Eiweißstoffwechsel mehr variabel ist und besonders durch Harnstoff als Stoffwechselendprodukt charakterisiert wird [1]). Diese Unabhängigkeit der endogenen Kreatininausscheidung von der Eiweißzufuhr habe ich auch in einer Untersuchungsreihe feststellen können. Während 12 Tagen nacheinander nahm ich kreatinfreie Kost ein; die sechs ersten Tage war ihr Eiweißgehalt sehr gering. Während der sechs letzten Tage dagegen war die Nahrung sehr eiweißreich. Die Kreatininausscheidung hielt sich jedoch die ganze Zeit ziemlich auf konstanter Höhe, mit nur kleinen, ungefähr gleich großen Schwankungen.

Meine nächste Frage galt dem Schicksal des von außen eingeführten Kreatins. In dieser Absicht nahm ich während einer 14 tägigen Versuchsserie an den meisten Tagen kreatinfreie Nahrung zu mir. Kreatin wurde nur an bestimmten Tagen entweder in genau abgewogenen Mengen von Rindfleisch (in Form von gehackten, ganz gelinde gerösteten Beefsteaks) oder in Fleischextraktlösung zugeführt. Jedesmal wurde teils der Gehalt des Harnes an präformiertem Kreatinin, teils nach Erwärmen des Harnes mit Salzsäure der Totalkreatiningehalt (Kreatinin + Kreatin) festgestellt. Die Differenz zwischen dem Gehalt von Totalkreatinin und von präformiertem Kreatinin gibt ein Maß von der Größe des ausgeschiedenen Kreatins, das jedoch in Kreatinin ausgedrückt wird. Es zeigte sich nun, daß die Einnahme von 800 bzw. 250 und 600 g Fleisch keinen merklichen Einfluß auf den Gehalt des Harnes an präformiertem Kreatinin hatte; er überstieg niemals das Maximum und wurde sogar einmal niedriger als das Minimum der fleischfreien Tage. Dagegen konnten immer an den Fleischtagen durch die vorhandenen Differenzen zwischen dem Totalkreatinin und dem präformierten Kreatinin größere oder kleinere Mengen Kreatin im Harn nachgewiesen werden. Nur einmal, nach dem Genuß von 250 g Fleisch (= 0,38 g Kreatin, als Kreatinin berechnet [2]), konnte so gut wie alles eingenommene Kreatin (89 Proz.) unverändert im Harn wiedergefunden werden. Nach sowohl 800 als 600 g war dagegen nur ein kleiner Bruchteil des darin enthaltenen Kreatins im Harn zu finden (34 bzw. 24 Proz.). Während der fleischfreien Tage aber war keine Differenz zu erkennen, die mit Sicherheit auf ein Vorhandensein von Kreatin im Harn hätte bezogen werden können.

---

[1]) American Journal of Physiology, Vol. XIII, No. 1 u. 2, 1905.

[2]) Nach einem durchschnittlichen Gehalt des Fleisches von 0,2 Proz. kristallisiertem Kreatin geschätzt.

Um ein etwas exakteres Maß des eingenommenen Kreatins zu bekommen, wurde an einem anderen Tage in derselben Serie eine sehr starke Lösung von Liebigschem Fleischextrakt eingenommen, worin vorher auf dieselbe Weise wie im Harn sowohl der Kreatin- als der Kreatiningehalt bestimmt worden war. Es ist nämlich eine bekannte Sache, daß bei der Darstellung des Fleischextraktes ein größerer oder kleinerer Teil des ursprünglichen Kreatins der frischen Muskeln, worin höchstens eine Spur von Kreatinin gefunden worden ist, durch das langwierige Erwärmen beim Abdampfen der großen Flüssigkeitsmengen in Kreatinin übergeführt wird. In diesem Falle wurde so durch die Fleichextraktlösung (eine Büchse von der kleinsten Größe, in 500 ccm Wasser aufgelöst) nur 0,89 g Kreatin (wie gewöhnlich als Kreatinin berechnet), dagegen 1,12 g Kreatinin zugeführt. Im Harn wurden nur 20 Proz. Kreatin wiedergefunden. Von dem eingenommenen Kreatinin sind also 63 Proz. als wiederausgeschieden anzusehen.

In einer letzten Serie habe ich die Ausscheidung bei gewöhnlicher, gemischter Diät mit verschieden großen Fleischquantitäten (am höchsten 225 g) während neun Tagen untersucht. Die Kreatininausscheidung hielt sich fortwährend normal. Dagegen konnten bisweilen kleinere Kreatinmengen nachgewiesen werden. Irgend welche Regelmäßigkeit hierin war jedoch nicht zu bemerken.

Während dieser Serie wurde außerdem eines Tages ein erneuerter Versuch mit Einnahme von Fleischextrakt gemacht. Diesmal wurden 2,66 g Kreatin und 1,60 g Kreatinin (zwei Büchsen in 800 ccm Wasser gelöst) eingenommen. Von dem zugeführten Kreatin wurden 31 Proz. und vom Kreatinin 45 Proz. wieder ausgeschieden.

Diese oben in aller Kürze beschriebenen Beobachtungen scheinen mir sehr für eine relative Unabhängigkeit der beiden Fleischbasen zu sprechen. Das von außen stammende „exogene“ Kreatin sowohl als Kreatinin werden teilweise unverändert durch die Nieren wieder als solche ausgeschieden, teilweise aber im Organismus offenbar auf irgend eine Weise ausgenutzt, das Kreatin, wie es scheint, etwas leichter als das Kreatinin. Die Annahme eines, sei es auch nur teilweisen Überganges des exogenen Kreatins in Kreatinin erhält jedenfalls durch meine Versuche keine Stütze.

Selbstverständlich müssen diese Untersuchungen weiter verfolgt werden, und ich hoffe, auch späterhin zu einer ausführlicheren Darstellung dieser und anderer damit zusammenhängender Fragen zurückkehren zu können.

Lund, am 22. Dezember 1905.

2. Über Fehlerquellen bei der Bestimmung des Acetons im Harn.

Von **L. Borchardt.**

Aus dem chemischen Laboratorium des städt. Krankenhauses Wiesbaden.

Nachdem Salkowski[1]), zum Teil in Gemeinschaft mit Tanigutti[2]) festgestellt hatte, daß aus Zucker bei Gegenwart von Mineralsäuren bei der Destillation jodbindende Substanzen übergehen, stellte Neuberg[3]) fest, daß die beim Diabetes gefundenen hohen Phenolwerte auf dieser Fehlerquelle beruhen, also falsch sind. Bekanntlich wird zur quantitativen Phenolbestimmung der konzentrierte, mit Schwefelsäure angesäuerte Urin destilliert, das Destillat mit Natronlauge und $n/10$-Jodlösung im Überschuß versetzt und aus dem gebildeten Jodoform die Menge des Phenols im Urin berechnet. Neuberg fand nun, daß auch hier bei zuckerhaltigem Urin ketonartige Substanzen, die gleichfalls Jodoform bilden, also zu hohe Werte vortäuschten, aus dem Urin abgespalten wurden und überdestillierten.

Die Bestimmung des Acetons im Urin beruht auf demselben Prinzip wie die des Phenols. Während man bei der Phenolbestimmung zunächst durch Einengen des Harns das Aceton beseitigt, wird umgekehrt bei der Acetonbestimmung der Urin zur Beseitigung der Phenole zuerst mit Essigsäure destilliert, in beiden Fällen wird die gesuchte Substanz durch ihr Jodbindungsvermögen quantitativ bestimmt.

Es lag nahe, daran zu denken, daß auch die Bestimmung des Acetons nach Messinger-Huppert durch das Vorhandensein von Zucker wegen Bildung von keton- und aldehydähnlichen Substanzen Fehler erleide. Schon Salkowski (l. c.) vermutete das und warnte deshalb davor, bei der Acetonbestimmung „die Destillation weit zu treiben“.

Bevor ich an die Prüfung dieser Frage ging, wurden folgende Vorversuche unternommen:

1. 100 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung wurden auf etwa 150 ccm verdünnt und der Destillation unterworfen. Im ersten Falle blieben im Destillationskolben 90 ccm zurück. Die Vorlage war in Eis gekühlt und mit einer zweiten Vorlage (Kugelapparat) verbunden, dessen Inhalt

---

[1]) Pflügers Archiv 56, 339 (1894).

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 476 (1890).

[3]) Ebenda 27, 123 (1899).

— genau wie bei der Acetonbestimmung — mit der ersten Vorlage vereinigt wurde. In der Vorlage wurden 0,6 mg jodoformbildende Substanz (als Aceton berechnet) gefunden, die also aus dem Zucker abgespalten waren.

Meine Dextroselösung war, wie ich nachweisen konnte, frei von jodbindenden Substanzen. War damit von vornherein festgestellt, daß bei der Destillation von Traubenzucker schon ohne Säurezusatz ketonartige Substanzen übergehen, die Jod bei alkalischer Reaktion zu Jodoform binden, so zeigte sich in weiteren Versuchen, daß die Menge dieser Substanzen bei weiterer Destillation zunimmt.

2. Aus 10 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung (es wurde stets auf etwa 150 ccm verdünnt) wurden bei der Destillation bis auf 5 ccm 0,5 mg, bei der Destillation bis auf 3 ccm 2,0 mg jodoformbildende Substanz abgespalten.

Die gleichen Resultate erhielt ich, wenn ich der Zuckerlösung 2 ccm Eisessig zufügte.

3. Aus 100 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung und 2 ccm Eisessig (auf etwa 200 ccm verdünnt) wurden durch Destillation bis auf 140 ccm 0,6 mg, durch Destillation bis auf 130 ccm 0,7 mg jodoformbildende Substanz gewonnen.

4. 10 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung und 2 ccm Eisessig (auf etwa 150 ccm verdünnt) ergaben bei Destillation bis auf 6 ccm 1,0 mg, bei Destillation bis auf den letzten Tropfen 1,6 mg jodbindende Substanz.

Bei so starker Konzentration muß man bedenken, daß die Flüssigkeit dabei sicherlich bis über den Siedepunkt überhitzt ist. Schließlich (in dem zuletzt angeführten Falle) ist eben keine Zuckerlösung mehr da, sondern geschmolzener Traubenzucker (Schmelzp. 146°), der sich chemisch ganz anders verhalten wird.

Durch Zufügen von Schwefelsäure konnten nun — wie schon Salkowski gefunden hatte — größere Mengen von Ketonen aus der Traubenzuckerlösung abgespalten werden.

5. Aus 100 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung und 2 ccm 50 proz. Schwefelsäure wurden bei Destillation bis auf 120 ccm 1,8 mg, bei Destillation bis auf 70 ccm 7,6 mg und bei Destillation bis auf 9 ccm sogar 22,1 mg jodoformbildende Substanz abgespalten.

Auch hier muß man sich den eingreifenden Prozeß vergegenwärtigen, den eine Lösung mit 12 g Traubenzucker erleidet, wenn sie bis auf 9 ccm eingeengt wird, d. h. wenn bereits 25 Proz. des Zuckers in einer veränderten Form überdestilliert sind.

6. Aus 10 ccm der Traubenzuckerlösung und 2 ccm 50 proz. Schwefelsäure konnte bei Destillation bis auf $5^1/_2$ ccm immer noch 3,4 mg, bei Destillation bis auf zwei Tropfen 8,7 mg jodoformbildende Substanz abgespalten werden.

Daraus geht hervor, daß 1. die Menge der abgespaltenen Ketone mit zunehmender Zuckermenge gleichfalls zunimmt; daß 2. die Schwefelsäure, da sie nicht mit überdestilliert, mit steigender Konzentration die Abspaltung der Ketone begünstigt, während der leicht flüchtigen Essigsäure katalytische Eigenschaften auf die Zersetzung des Zuckers nicht zukommen.

Nach diesen Vorversuchen, welche zeigen, daß man bereits ohne Säurezusatz geringe Ketonmengen aus nicht zu konzentrierten Traubenzuckerlösungen durch Erhitzen abspalten kann, größere nach Zusatz von Schwefelsäure, ging ich dazu über, diese Vorgänge bei gleichzeitigem Vorhandensein von Aceton zu prüfen. Zu meinen Versuchen diente eine Acetonlösung, deren Gehalt an Aceton (Mittel aus drei Analysen) 0,075 Proz. (0,0038 g in 5 ccm) betrug.

Es ergaben sich bei Zusatz von Traubenzuckerlösung noch wesentlichere Unterschiede, je nachdem ich nur bis etwa zur Hälfte oder bis auf wenige Cubikcentimeter abdestillierte. Im ersteren Falle wurden leidlich richtige Resultate erzielt, im letzteren weit höhere Zahlen, als der verwendeten Acetonlösung entsprach.

7. 5 ccm der Acetonlösung und 10 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung (und etwa 150 Wasser) lieferten bei Destillation bis auf etwa die Hälfte in zwei Analysen 4,1 mg jodoformbildender Substanz (statt 3,8 mg Aceton). Ebenso wurde nach Zusatz von 2 ccm 50 proz. Schwefelsäure zu dieser Mischung unter denselben Bedingungen 3,9 (statt 3,8) mg Aceton erhalten. Ganz anders, wenn bis auf wenige Cubikcentimeter eingedampft wurde.

8. 5 ccm der Acetonlösung und 10 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung wurden mit etwa 150 Wasser bis auf 7 ccm, im zweiten Falle bis auf $^1/_2$ ccm abdestilliert, im ersten Falle wurden 5,4, im anderen 6,7 mg Aceton (statt 3,8 mg) gefunden.

Dieselben Resultate fand ich nach Zusatz von Essigsäure.

9. 5 ccm der Acetonlösung und 10 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung und 2 ccm Eisessig liefern bei der Destillation bis auf $4^1/_2$ ccm 4,9 mg, bei Destillation bis auf 1 ccm 7,3 (statt 3,8) mg Aceton.

Aus der benutzten Zuckermenge konnten im Maximum — mit oder ohne Zusatz von Essigsäure (Versuch 2) — 2,0 mg Aceton erwartet werden, so daß die erwartete Acetonausscheidung (inkl. der zugesetzten 3,8 mg Aceton) 5,8 mg betrug. Wie man sieht, wurde mitunter noch etwas mehr Aceton auf katalytischem Wege abgespalten. Auf die Erklärung dieses Vorganges komme ich später zu sprechen. Auch hier bringt der Zusatz von Schwefelsäure größere Fehler mit sich.

10. Aus 5 ccm der Acetonlösung, 10 ccm 12 proz. Traubenzuckerlösung und 2 ccm 50 proz. Schwefelsäure entstehen bei Destillation bis auf 14,5 ccm 15,1 mg, bei Destillation bis auf den letzten Tropfen 24,1 mg Aceton (statt 3,8 mg).

Die gebildete Acetonmenge (ich bezeichne die Summe der gebildeten Ketone der Einfachheit halber als Aceton, weil sie als Aceton berechnet wurde) übertrifft bei weitem die Summe des Acetons und der aus der gleichen Menge Traubenzucker bei Schwefelsäurezusatz allein abspaltbaren Ketone. Letztere hatten höchstens 8,7 mg jodoformbildende Substanz (vgl. Versuch 6) geliefert; rechnen wir dazu die 3,8 mg Aceton, die der Zuckerlösung zugesetzt waren und mit überdestillierten, so durften höchstens 12,5 mg erwartet werden; statt dessen wurden 15,1 bzw. 24,1 mg jodoformbildende Substanz gefunden.

Die Erklärung dieses Resultates ist nicht leicht. Sicher spielen hier katalytische Prozesse eine Rolle. Nur daß mehrere katalytische

Prozesse nebeneinander gehen. Daß die Schwefelsäure katalytisch auf die Zersetzung des Traubenzuckers wirkt, war schon von Salkowski (l. c.) gefunden worden. Nun sprechen meine Versuche 1 und 2 und 3 und 4 dafür, daß bei der Destillation auch die Autokatalyse des Traubenzuckers eine gewisse, allerdings sehr geringe Rolle spielt. Die Reaktion wird jedenfalls mit der Zeit stärker und nicht schwächer; doch sind meine Versuche nicht geeignet, über den Grad der Autokatalyse Sicheres auszusagen. Die Gegenwart von Aceton (Versuch 8 und 9) wirkt nun gleichfalls katalytisch auf die Zuckerlösung; doch scheint seine Wirkung qualitativ nicht anders zu sein als die der abgespaltenen Ketone, nur daß sie sich zu dieser eben noch hinzuaddiert. Wir dürfen also in Versuch 10 doch wohl nur von zwei und nicht von drei katalytischen Prozessen sprechen: dem durch die Schwefelsäure bedingten einerseits, dem durch das zugefügte Aceton und die abgespaltenen Ketone (letzteres Autokatalyse) bedingten andererseits. Daß diese Prozesse sich nicht einfach addieren, sondern in ihrer Gesamtheit weit stärkere katalytische Wirkungen hervorrufen, ist nicht wunderbar und hat Analogien. Bredig[1]) beschreibt in seiner Arbeit „Die Elemente der chemischen Kinetik, mit besonderer Berücksichtigung der Katalyse usw." einen ganz ähnlichen Vorgang: „So greift z. B. nach Millon, Veley, Ihle", sagt er, „die reine Salpetersäure, welche frei von salpetriger Säure ist, viele sonst leicht von ihr oxydierbare Stoffe, wie Kupfer, Quecksilber, Wismut, Silber, Zink usw., kaum an, dieser Angriff wird aber sofort nach Zufügung einer Spur Nitrit recht merklich und steigert sich mit der Zeit immer lebhafter in dem Maße, als durch die Reduktion der Salpetersäure die dabei katalytisch wirkende salpetrige Säure sich bildet und durch Autokatalyse vermehrt."

So sehr danach diese Auffassung mit den Vorstellungen, die wir uns heute von den katalytischen Vorgängen machen, übereinstimmt, so müssen wir uns doch fragen, ob nicht noch andere Erklärungen für diese Prozesse möglich wären. Ich will hier noch eine Möglichkeit erwähnen. Im Jahre 1895 beschrieb Emil Fischer[2]) zwei Verbindungen des Acetons mit dem Traubenzucker: das Glycose-di-aceton und das Glycoseaceton, aus dem das erstere entstehen kann. Beide bildeten sich unter dem Einflusse verdünnter Salzsäure, also unter recht ähnlichen Bedingungen wie in meinen Versuchen. Es wäre möglich, daß sich solche Verbindungen unter dem Einfluß der Schwefelsäure zunächst gebildet hätten, und daß nun diese Verbindungen durch Autokatalyse oder durch Einfluß der Schwefelsäure bei weiterem Erhitzen wieder zerfielen und größere Mengen Ketone abspalteten.

Auf eine Begründung der einen oder anderen Anschauung wurde verzichtet, da die Erkenntnis dieser Vorgänge mir nicht von größerem Interesse erschien.

Die von mir gefundenen Beziehungen zwischen Aceton und den aus Traubenzucker abspaltbaren Ketonen scheinen mir in mancher

---

[1]) Erg. d. Physiol. 1 [1], 144 (1902).

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 28, 1162 u. 2496 (1895).

Richtung beachtenswerte praktische Winke zu geben. Zunächst bedarf die allenthalben übliche Vorschrift, bei der quantitativen Acetonbestimmung bis auf $^1/_{10}$ des Volumens einzudampfen[1]), bei zuckerhaltigen Urinen durchaus der Korrektur. Entweder muß der Urin vor der Destillation so stark mit Wasser verdünnt werden, daß im Destillationskolben mehr als 50 ccm Rückstand bleiben, oder man geht sicherer, durch Zutropfenlassen von Wasser aus einem Tropftrichter zu starke Einengung zu vermeiden. Aber auch unter Einhaltung dieser Kautelen läßt sich eine Abspaltung von Ketonen aus dem diabetischen Urin nicht ganz vermeiden. — Bei zuckerfreien Urinen ist diese Vorsicht dagegen nicht notwendig.

Meine Versuche sprechen aber auch entschieden gegen die Anwendung der von Geelmuyden[2]) neuerdings angegebenen vereinfachten Acetonbestimmung bei Urinen von Diabetikern. Geelmuyden verzichtet auf die Destillation mit Essigsäure und empfiehlt die Acetonbestimmung nach einmaliger Destillation mit Schwefelsäure. Hier wird der Zusatz von Schwefelsäure zum zuckerhaltigen Urin sich durch Abspaltung von Ketonen rächen, die den Wert der Bestimmung illusorisch machen.

Dagegen sei zugestanden, daß die Acetonbestimmung nach Geelmuyden in den Fällen Anwendung verdient, in denen es sich um zuckerfreie Urine handelt. Ich habe in zahlreichen Parallelbestimmungen nach Messinger-Huppert und nach Geelmuyden in zuckerfreien Urinen ganz übereinstimmende Resultate erhalten und kann die Modifikation von Geelmuyden für diese Fälle durchaus empfehlen.

---

[1]) Huppert-Neubauer, Harnanalyse, 1898, S. 764; Waldvogel, Die Acetonkörper, 1903, S. 16; Hoppe-Seyler-Thierfelder, Chemische Analyse, 1903, S. 448. Nach Geelmuyden, Zeitschr. f. analyt. Chem. 35, 303, ref. n. Malys Jahresber. 26 (1897), soll man sogar bis fast zur Trockne abdestillieren.

[2]) Zeitschr. f. klin. Med. 58, 1 (1905).

Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

VIII. Band 3. und 4. Heft

(Ausgegeben April 1906)

Braunschweig
Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1906

Inhalt des 3. und 4. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

VI.

Untersuchungen über Blutgerinnung.

Von **Leo Loeb**.

Aus dem pathologischen Laboratorium der University of Pennsylvania, Philadelphia, und aus dem Marine Biological Laboratory, Woods Holl, Mass.

Siebente Mitteilung.

Die folgenden Untersuchungen stellen eine Weiterführung von früher mitgeteilten Versuchen über die Blutgerinnung bei Wirbellosen [1]) dar.

In der vorhergehenden Mitteilung hatte ich gezeigt, daß die Bedingungen der Gerinnung des Blutplasmas bei Wirbellosen und bei Wirbeltieren sehr ähnlich sind. Bei beiden Tierklassen sind zwei Substanzen von wesentlicher Bedeutung für die Blutgerinnung: 1. die aus den Blutzellen stammenden Substanzen, und 2. die aus den meisten Geweben extrahierbaren Gewebskoaguline. Erstere sind in dem Zustande, wie wir sie nach abgelaufener Gerinnung in dem Serum oder in dem Koagulum finden, von der Anwesenheit löslicher Calciumsalze mehr oder weniger unabhängig; letztere bewirken nur bei Anwesenheit bestimmter Mengen von Calcium die Koagulation von Blutplasma oder Fibrinogenlösungen. In bezug auf die Ergebnisse im einzelnen, sowie auf andere Unterschiede zwischen diesen beiden Substanzen, die sich in ähnlicher Weise bei Wirbeltieren und Wirbellosen finden, sei auf die frühere Arbeit verwiesen. Der Umstand, daß eine wirkliche Aktivierung der aus den Blutzellen gewonnenen Substanzen durch die Gewebskoaguline nicht stattfand — Blutserum oder Blutzellenextrakt erhöhten die Wirkung einer Mischung von Calciumchlorid und Muskelextrakt nur additiv —, sowie die Tatsache, daß

---

[1]) Untersuchungen über Blutgerinnung. Sechste Mitteilung. Diese Beiträge **6**, 260 (1905).

auf 52° oder sogar auf 56° erwärmtes Hummerplasma, in welchem alles Fibrinferment und vermutlich auch das supponierte Proferment zerstört waren, noch fast ebenso schnell unter dem Einfluß der Gewebskoaguline koagulierten, wiesen darauf hin, daß die Gewebskoaguline direkt am Fibrinogen angreifen und nicht nur indirekt als Kinase wirken, indem sie das Prothrombin in Thrombin umwandeln. Diese Schlußfolgerung kann auf die Wirbeltierblutgerinnung ausgedehnt werden, nicht nur wegen der zwischen der Blutkoagulation der Wirbellosen und Wirbeltiere bestehenden Ähnlichkeiten, sondern auch, weil sich in einer früheren Untersuchung [1]) Tatsachen ergeben haben, die gegen die zweite Annahme sprechen.

Im weiteren sollen nun diese beiden Substanzen noch genauer in bezug auf ihr Verhalten gegen verschiedene Substanzen, insbesondere Salze, untersucht werden, und sodann soll direkt durch den Versuch bestimmt werden, ob Thrombin unter der Einwirkung der Gewebskoaguline (Thrombokinasen von Morawitz) entsteht.

1. Über die Herstellung der Thrombinlösungen. In den früheren Untersuchungen hatte sich ergeben, daß durch Extraktion des Zellfibrins mit verschiedenen Substanzen sich wirksame Thrombinlösungen herstellen lassen. Es ergab sich hierbei ein Unterschied zwischen verschiedenen Extraktionsmitteln, indem mit 4proz. Kochsalzlösung hergestellte Extrakte ganz oder fast ganz unwirksam waren. Durch Zusatz einer bestimmten Menge Calciumchlorid zu der Kochsalzlösung wurde die Wirksamkeit erhöht [2]). Durch Extraktion mit erhitztem, also an sich unwirksamem Hummermuskelextrakt ergaben sich wirksame Fermentlösungen. Es ist nun möglich, auf viel einfachere Weise wirksames Thrombin zu erhalten, indem man die zweite Gerinnung des dem Hummer entnommenen Blutes ungestört vor sich gehen läßt und dann, etwa nach Ablauf einer halben Stunde oder einer Stunde bei Zimmertemperatur das Serum auspreßt. Dieses Serum ist gewöhnlich recht wirksam.

Man kann das Koagulum einen oder mehrere Tage auf Eis stehen lassen und nach dem Auspressen noch wirksames Serum erhalten. Konstante Unterschiede zwischen der Wirksamkeit der nach verschiedenen Zeiten ausgepreßten Sera ergaben sich nicht. Die Möglichkeit, auf diese Weise kräftige Thrombinlösungen zu

---

[1]) Diese Beiträge 5, 534 (1904).

[2]) Die Bedeutung des Calciumchlorids ist in diesem Falle noch unsicher. Die erhöhte Wirksamkeit desselben bei frühzeitigem Zusatz (im Gegensatz zu nachträglichem Zusatz) findet sich nicht in allen Versuchen.

erhalten, gilt nur für gesunde Tiere. Tiere, die nicht mehr lebenskräftig sind, liefern gewöhnlich ganz unwirksames Serum.

Wir müssen annehmen, daß bei dieser Darstellungsweise von Thrombinlösungen ein wirksames Serum erhalten wird, weil die Blutzellen auf die bestmögliche Weise in dem Blute verteilt bleiben und dann den wirksamen Stoff an das umgebende Plasma abgeben, ob in Form einer Vorstufe, die etwa unter dem Einfluß eines Ions in dem Plasma zu wirksamem Ferment umgewandelt wird, oder direkt als Ferment, ist nicht sicher.

2. Entnehmen wir direkt nach Beendigung der sog. ersten Gerinnung, die durch Schütteln des Blutes des Hummers beschleunigt wurde, das Zellfibrin und filtrieren das Plasma, so gerinnt das nicht verdünnte und nicht erwärmte Plasma nach einiger Zeit, etwa nach Ablauf mehrerer Stunden, spontan. Preßt man das Serum in diesem Falle aus, so läßt sich in demselben kein Thrombin nachweisen; die die Gerinnung verursachende Thrombinmenge war zu gering. Dies ist ein weiterer Beweis, daß die die Gerinnung verursachende Substanz aus den Blutzellen extrahiert wird.

3. Läßt sich Thrombin in Blut nachweisen, das auf Eis gehalten wird? Fängt man Hummerblut in einer Glasschale auf, die vorher in einer Salzeismischung abgekühlt worden war und sodann in schmelzendem Eise gehalten wird, so kann die Gerinnung ganz verhindert oder sehr verlangsamt werden. Verteilt man das Blut eines Hummers in dünner Schicht auf zwei Schalen, und hält man die eine, wie oben angegeben, auf Eis, die andere bei Zimmertemperatur, so tritt gewöhnlich im Verlauf von $1/2$ bis 1 Stunde in letzterer Schale Gerinnung ein. Vergleicht man nun das Blutplasma bzw. Blutserum in beiden Schalen zu bestimmten Zeiten, so wird man einen merklichen Unterschied in dem Thrombingehalt beider Flüssigkeiten finden. Das auf Eis gehaltene Blut enthält kein oder nur sehr wenig Thrombin, das bei Zimmertemperatur gehaltene Blut enthält viel Thrombin. Solche vergleichende Prüfungen an demselben Blute wurden in einer größeren Anzahl von Versuchen angestellt, 24 Minuten bis mehrere Stunden nach Entnahme des Blutes. Es ergibt sich daraus, daß die wirksame Substanz unter den angegebenen Bedingungen in der Kälte nicht oder nur in sehr geringer Menge extrahiert werden kann. Auch eine eventuell vorhandene Vorstufe wird nicht extrahiert, da diese sich ja nachher bei Zimmertemperatur schnell in Ferment umwandeln müßte. Die Wirksamkeit des Plasmas oder Serums

wurde in jedem Falle auf die früher angegebene Weise gegenüber Hummerplasma geprüft.

Die Tatsache, daß in auf Eis gehaltenem Hummerblut kein oder nur wenig Thrombin vorhanden ist, kann auf verschiedene Weise erklärt werden. a) In auf Eis gehaltenem Blute tritt keine oder nur eine geringfügige Gerinnung ein. Die Blutzellen werden daher nicht von einem gelatinösen Koagulum umgeben, sondern sinken zu Boden. Im Blut, welches im Zimmer gehalten wird, tritt hingegen bald ein wenig Koagulation ein, die Blutzellen bleiben daher im Plasma verteilt und dieser Zustand ist für die Extraktion des Thrombins günstiger als wenn die Blutzellen den Boden der Glasschale bedecken. Gegen diese Erklärungsweise sprechen folgende Tatsachen: 1. Das Blut bildet nur eine dünne Lage, so daß der Unterschied in der Diffusion des Thrombins in das Plasma in beiden Fällen nicht sehr groß sein sollte. 2. Wenn das Blut bei Zimmertemperatur gehalten wird, werden bald die einzelnen Zellen von einer Schicht gelatinösen Koagulums umgeben, welches, wie früher gezeigt wurde, die Diffusion des Thrombins zuläßt, aber wahrscheinlich erschwert. Dieser Faktor sollte also die Diffusion des in der Kälte gehaltenen Thrombins begünstigen. b) Die Kälte verhindert chemische Umsetzungen in den Blutzellen. Fängt man Limulusblut mit einer Kanüle auf Objektträgern auf und hält einige Objektträger auf Eis, andere bei Zimmertemperatur, so breiten sich auf den letzteren die dem Glase aufliegenden Zellen aus, sie strecken Pseudopodien aus und verlieren eine sehr große Zahl ihrer Granula. Auf Eis werden diese Vorgänge sehr eingeschränkt. Sehr viele Zellen bleiben auch in Berührung mit dem Glase lange kontrahiert, eine größere Zahl ihrer Granula bleibt erhalten, die Pseudopodien bleiben eine Zeitlang nur ganz kurz. Der Unterschied in dem Verhalten der Zellen deutet darauf hin, daß entweder auf Eis viel weniger Thrombin in den Zellen produziert wird, oder daß das Thrombin oder seine Vorstufe die kontrahierten Zellen nur viel langsamer verlassen kann, als die stark ausgebreiteten Zellen.

Die unter b angeführte Erklärungsweise ist wahrscheinlich zutreffend. Doch sind weitere Versuche zur genaueren Analyse dieses Vorganges nötig.

4. Aber auch wenn man fertig gebildetes Thrombin mit Hummerplasma mischt, welches in einer schmelzenden Eislösung gehalten wird, wird die Gerinnung ganz aufgehoben oder sehr verzögert. Ebenso wirkt die Kälte auf Muskelextrakt. Bei 0° ist er unwirksam. Findet in beiden Fällen allmählich doch noch, wenn auch stark verzögert, Gerinnung statt, so beruht das vermutlich darauf, daß die Temperatur zeitweise etwas höher war.

5. Herstellung des Extraktes aus Hummermuskel. Bei 2 bis 5 Minuten langer Extraktion mit destilliertem Wasser kann aus zerstoßenem Hummermuskel nur ein sehr wenig wirksames Extrakt erhalten werden. $2^1/_2$- bis 3stündiges Ausziehen mit Wasser liefert hingegen ein recht wirksames Extrakt. Zerstoßener Muskel, der über Nacht extrahiert worden war, kann zum zweiten Male extrahiert werden und liefert wiederum ein wirksames Extrakt.

Extrahiert man zerstoßenen Muskel anstatt mit destilliertem Wasser mit Seewasser, so wird die Flüssigkeit von dem Muskel aufgenommen und nur sehr wenig Flüssigkeit kann ausgepreßt werden. Setzt man solchen zerstoßenen Muskel, der Seewasser aufgenommen hat und über Nacht auf Eis gehalten worden war, dem Hummerplasma zu, so ist seine gerinnungserregende Kraft nur sehr gering.

6. Über die hemmende Substanz des Hummermuskelextraktes. Schon 2 bis 5 Minuten lange Extraktion des zerstoßenen Muskels genügt, um die hemmende Substanz des Muskelextraktes zu extrahieren. Sie wird also viel leichter von destilliertem Wasser extrahiert als die gerinnungsbeschleunigende. Kürzlich wurde von Pugliese[1]) auch aus den Geweben von Wirbeltieren eine die Gerinnung hemmende Substanz extrahiert.

Wie schon früher angegeben, wird diese hemmende Substanz nicht durch Zufügen verschiedener Mengen von Alkali (Neutralisation gegen Lackmus und gegen Phenolphthaleïn) neutralisiert. Es ergab sich in weiteren Versuchen, daß sie sehr verschieden stark auf Gewebskoaguline und auf Thrombinlösungen wirkte. Die gerinnungserregende Wirkung von Muskelextrakt wird durch erhitztes und filtriertes Muskelextrakt sehr stark gehemmt oder aufgehoben. Zellfibrinextrakt (Thrombin) wird hingegen nur wenig, oft fast gar nicht, durch erhitztes Muskelextrakt gehemmt. Wenn man zu 3 ccm Hummerplasma und 1 ccm Zellfibrinextrakt 2 ccm erhitztes Muskelextrakt fügt, so braucht die Verlängerung der Gerinnungszeit nur 50 bis 100 Proz. oder noch weniger zu betragen. Mit 1 ccm erhitzten Muskelextrakts beträgt die Verlängerung der Gerinnungszeit 20 bis 50 Proz., oder sie kann ganz fehlen.

Gewebskoaguline und Thrombinlösungen unterscheiden sich nun merklich durch ihre verschieden hohe Empfindlichkeit gegenüber Calciumentziehung; erstere sind sehr empfindlich, letztere wenig oder gar nicht. Es lag daher nahe, anzunehmen, daß die hemmende Substanz wahrscheinlich durch Bindung des Calciums wirkt. Dementsprechend ergaben Versuche, daß durch Calciumzusatz die hemmende Substanz größtenteils neutralisiert werden kann. Es ist wahrscheinlich, daß diese hemmende Substanz organischer Natur ist. Durch Kochen wird sie nicht zerstört. Von anorganischen Substanzen kämen hauptsächlich Phosphate in Betracht. Diese können aber mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen

---

[1]) Journal de Physiologie et de Pathologie générale, Tome VII, 1905.

werden, da sie anders wirken. Sie verlangsamen die Gerinnung und verursachen Trübung, und nach längerer Zeit scheiden sich kleinere oder größere Flocken aus, wenn zu 3 ccm Hummerplasma 0,25 ccm Muskelextrakt und 1 ccm Normallösung von NaH_2Po_4 oder Na_2HPo_4 hinzugefügt werden.

Eine so große Trübung wird durch erhitztes Muskelextrakt nicht verursacht; es können in demselben nur sehr viel weniger Phosphate vorhanden sein; auch ist die Hemmung der Gerinnung durch erhitztes Muskelextrakt vollständiger als durch in gleicher Menge zugesetzte Phosphate. Im Hodenextrakt des Hummers sowie im Muskelextrakt eines Salzwasserfisches, Cynoscion regale, ließ sich ebenfalls eine gerinnungshemmende Substanz nachweisen; sie war aber viel schwächer wirksam als die im Hummer und Limulus vorhandene.

7. Neutralisation der hemmenden Substanz des Muskelextraktes durch Calciumchlorid. Setzt man zu 3 ccm Hummerplasma, das auf die früher angegebene Weise hergestellt war, 1 ccm erhitztes filtriertes Muskelextrakt und 0,25 ccm wirksames Muskelextrakt, so wird die Gerinnung manchmal ganz aufgehoben, gewöhnlich tritt sie statt in einigen Minuten in mehreren Stunden ein. Durch Chlorcalciumzusatz kann eine solche Beschleunigung eintreten, daß die Gerinnung statt in mehreren Stunden in etwa 4 bis 6 Minuten eintritt. Würde man aber Calciumchlorid zu dem Hummerplasma ohne die hemmende Substanz zusetzen, so würde die Gerinnung noch viel schneller, nämlich in 1/2 bis 1 Minute eintreten. Also findet auch in diesem Falle noch eine Verzögerung um das 4- bis 10 fache statt, trotz Zufügens von Calciumchlorid. Das Optimum des Zusatzes wechselt in verschiedenen Fällen (0,25 bis 1 ccm n-$CaCl_2$) bei der oben angegebenen Mischung. Calciumchlorid ruft in dem erhitzten Muskelextrakt ein Präcipital hervor. Magnesiumchlorid wirkt ähnlich wie Calciumchlorid, ohne einen Niederschlag zu erzeugen; doch wirkt es etwas schwächer. In ganz unverdünntem Hummerplasma wirkt erhitztes Muskelextrakt auch hemmend, aber nicht so stark, wie in dem gewöhnlichen Plasma, das ein wenig mit destilliertem Wasser verdünnt ist. Dieser Unterschied ist wohl dadurch bedingt, daß unverdünntes Plasma mehr Calciumchlorid pro Volumeinheit enthält.

8. Wie beeinflußt ein zu verschiedenen Zeiten erfolgender Zusatz der in den Geweben vorhandenen hemmenden Substanz zu Hummerplasma die Gerinnung nach

vorhergegangener Mischung von Hummerplasma mit wirksamem Muskelextrakt?

Zu diesen Versuchen wurde verdünntes Muskelextrakt verwandt, welches ohne Zusatz hemmender Substanz das Hummerplasma in etwa 4 Minuten oder bei stärkerer Verdünnung noch später zur Gerinnung brachte.

Fügt man die hemmende Substanz in der ersten Hälfte der normalen Gerinnungszeit (das ist die bis zum Beginn der Gerinnung ohne Zusatz von hemmender Substanz nötige Zeit) zu, so wird die Gerinnung für lange Zeit ganz oder fast ganz aufgehoben. Nach Zusatz in der zweiten Hälfte der normalen Gerinnungszeit wird bei Benutzung von schwachem Muskelextrakt, das die vollständige Gerinnung des Hummerplasmas ohne hemmende Substanz in etwa 11 Minuten bewirken kann, ebenfalls die Gerinnung ganz oder fast ganz verhindert. Mit stärkerem Muskelextrakt bildet sich gewöhnlich, wenn kurz vor Beginn der normalen Gerinnung die hemmende Substanz (1 ccm) zugesetzt wird, ein kleines Gerinnsel; nach einiger Zeit können sich einige weitere Fäden bilden, aber die Gerinnung bleibt mehr oder weniger unvollständig. Also die hemmende Substanz äußert ihre Wirkung noch, wenn sie kurz vor Beginn der normalen Gerinnung zugefügt wird; je früher sie zugesetzt wird, desto stärker wirkt sie. Kontrollversuche zeigen, daß Wasser oder n/2-NaCl, in ähnlicher Weise zugefügt, nur eine sehr geringe Wirkung haben.

Es folgt aus diesen Versuchen, daß wir während der unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattfindenden Gerinnung nicht zwei Phasen unterscheiden können: eine erste Phase, in der Muskelextrakt und Calcium das Prothrombin in Thrombin umwandeln und in der sich die hemmende Substanz geltend machen sollte, sodann eine zweite Phase, in der das gebildete Thrombin Fibrinogen in Fibrin umwandelt, und worin die hemmende Substanz ohne oder fast ohne Wirkung sein sollte, da das Thrombin durch die hemmende Substanz nur wenig beeinflußt wird. Wenn Muskelextrakt z. B. in 4 Minuten die Gerinnung des Hummerplasmas bewirkt, so müßte schon nach 1 bis 2 Minuten eine so beträchtliche Menge Thrombin vorhanden sein, daß sie die Gerinnung des Hummerplasmas mit einer nur geringen Verzögerung zu Ende zu führen imstande sein sollte. Das Ergebnis dieser Versuche beweist, daß solches Thrombin sich nicht bildet.

In ähnlicher Weise wirkt Zusatz von 0,2 n/2-NaFl auf die durch Muskelextrakt bewirkte Gerinnung oder Zusatz einer etwas größeren Menge von n/2-NaFl auf die durch Thrombin bewirkte Gerinnung. Je später das Natriumfluorid zugesetzt wird, desto geringer ist die hemmende Wirkung.

9. Wie wirken Alkalisalze auf die durch Muskelextrakt bewirkte Gerinnung? Die Wirkung der Alkalisalze auf die Gerinnung wurde gesondert für die durch Gewebskoaguline (Muskelextrakt), wie für die durch Thrombin (Zellfibrinextrakt)

bewirkte Gerinnung untersucht. Entweder wurde eine bestimmte Menge äquimolekularer Salzlösung zu 3 ccm Hummerplasma hinzugefügt und dann Muskelextrakt oder Zellfibrinextrakt damit gemischt, oder das Hummerplasma wurde in bestimmten Verhältnissen mit 2/n-Salzlösungen gemischt und zu je 3 ccm der Mischung die gerinnungserregende Substanz hinzugefügt. Auf die Thrombingerinnung wirken NaCl, LiCl, KCl, CsCl ungefähr in gleicher Weise ein; NH_4Cl hingegen wirkt stärker hemmend. Auch RbCl[1]) wirkt stärker hemmend, aber nicht so stark wie NH_4Cl. Mit Muskelextrakt ist die Differenz zwischen den einzelnen Salzen größer. NaCl wirkt wie LiCl. KCl wirkt hier aber stärker hemmend. CsCl wirkt ungefähr wie KCl oder etwas weniger hemmend; NH_4Cl wirkt am stärksten hemmend und RbCl etwas schwächer als NH_4Cl. Die hemmende Wirkung des NH_4Cl war auch in ganz frisch bereiteten Lösungen vorhanden. Mit Muskelextrakt ist die Reihenfolge der hemmenden Wirkung die folgende:

1. NaCl (= LiCl), 2. CsCl, 3. KCl, 4. RbCl, 5. NH_4Cl;

mit Zellfibrinextrakt:

1. NaCl (= LiCl, = CsCl, = KCl), 2. RbCl, 3. NH_4Cl.

Kleine Mengen von NaCl wirken, wie früher angegeben, auf Muskelextrakt günstiger als Wasser. Auf Zellfibrinextrakt wirken geringe Mengen n/2-NaCl entweder gleich gut wie Wasser oder dieses wirkt etwas besser. In etwas größeren Mengen wirkt Wasser merklich besser auf die Zellfibrinextraktgerinnung als Kochsalz.

(ME = Muskelextrakt, HP = Hummerplasma, 20 Teile verdünnt mit 14 Teilen destillierten Wassers, FiE = Zellfibrinextrakt oder Serum, das nach beendigter zweiter Gerinnung aus dem Koagulum gepreßt wurde.)

3 ccm HP + 2 ccm n/2-NaCl + 1 ccm FiE: 16 Min. 15 Sek. bis 17 Min. 45 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-KCl + 1 ccm FiE: 15 Min. 50 Sek. bis 16 Min. 50 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-LiCl + 1 ccm FiE: 16 Min. 40 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-CsCl + 1 ccm FiE: 20 Min. 15 Sek. bis 21 Min. 45 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-RbCl + 1 ccm FiE: nach 1½ Std. noch nicht koaguliert.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-NH_4Cl + 1 ccm FiE: nach 1½ Std. noch nicht koaguliert.

3 ccm HP + 2 ccm n/2-NaCl + ¼ ccm ME: 1 Min. 45 Sek. bis 2 Min. 10 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-LiCl + ¼ ccm ME: 1 Min. 30 Sek. bis 2 Min. 10 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-KCl + ¼ ccm ME: 7 Min. 10 Sek. bis 7 Min. 40 Sek.

---

[1]) Alle in diesen Untersuchungen benutzten Salze waren Kahlbaumsche Präparate, mit Ausnahme von CsCl und RbCl. Die Untersuchungen wurden in zwei verschiedenen Jahren mit verschiedenen Proben der Salze angestellt. Das Ergebnis war übereinstimmend mit Ausnahme von RbCl, von dem die zweite Probe stärker hemmend gefunden wurde, als das im ersten Jahre benutzte (Mercksche) Präparat.

3 ccm HP + 2 ccm n/2-CsCl + 1/4 ccm ME: 4 Min. 20 Sek. bis 4 Min. 50 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-RbCl + 1/4 ccm ME: 15 Min. 10 Sek. bis 16 Min. 50 Sek.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-NH_4Cl + 1/4 ccm ME: Noch nicht koaguliert nach 1 Std. 40 Min.
3 ccm HP + 2 ccm H_2O + 1/4 ccm ME: 8 Min. 25 Sek. bis 8 Min. 55 Sek.

10. Einfluß des Zusatzes von Calciumchlorid auf die spontane Gerinnung und auf die durch Zellfibrinextrakt bewirkte Gerinnung des Hummerplasmas. Die in der vorigen Mitteilung angegebenen Resultate wurden einer genaueren Nachprüfung unterworfen. Ein bis drei Tropfen n-Chlorcalciumlösung zu unverdünntem, unerhitztem Hummerplasma gefügt, bewirken keine oder nur eine geringfügige Beschleunigung der Gerinnung; dieselbe beträgt im Maximum 25 Proz. Die durch Zellfibrinextrakt bewirkte Gerinnung wird bei unverdünntem Hummerplasma nicht beschleunigt. Auch die Gerinnung des gewöhnlich benutzten, etwas verdünnten Hummerplasmas und sogar stark verdünnten (ein Teil in gewöhnlicher Weise verdünntes Hummerplasma auf zwei Teile destilliertes Wasser) wird durch geringe Mengen (bis 0,25 n-$CaCl_2$ auf 3 ccm HP) nicht oder nur geringfügig beschleunigt. Die Beschleunigung beträgt im Maximum 25 Proz. 0,5 n-$CaCl_2$ wirkt hemmend auf 3 ccm HP + 1 ccm FiE.

11. Einfluß der Verdünnung des Hummerplasmas auf die unter dem Einfluß des Muskelextraktes stattfindende Gerinnung. In der vorhergehenden Mitteilung wurde gezeigt, daß bei Verdünnung des Hummerplasmas mit destilliertem Wasser die Gewebskoaguline unwirksam werden, die Zellfibrinextrakte hingegen in ihrer Wirksamkeit nicht wesentlich geschwächt werden. Das Hummerplasma verhält sich also ähnlich wie Gänseplasma. Im weiteren wurde nun untersucht, welche Substanzen für die Gerinnung des Hummerplasmas von Bedeutung sind, so daß deren Verdünnung die Wirksamkeit der Gewebskoaguline vermindert oder aufhebt.

Zwei Verdünnungen des Hummerplasmas wurden geprüft: a) 1 Teil in gewöhnlicher Weise hergestelltes und in bestimmtem Verhältnis mit Wasser verdünntes Hummerplasma + 1 Teil des zu prüfenden Verdünnungsmittels; b) 1 Teil gewöhnlichen Hummerplasmas + 3 Teile Verdünnungsmittel.

Zur Verdünnung wurden benutzt: H_2O, n/2-NaCl, Seewasser, auf 52° erwärmtes Hummerserum, 3 Volumteile H_2O + 1 Teil n-$CaCl_2$, 3 Teile H_2O + 1 Teil n-$SrCl_2$ (oder $BaCl_2$ oder $MgCl_2$), 3 Teile n/2-NaCl + 1 Teil n-$CaCl_2$ (oder n-$SrCl_2$, oder n-$BaCl_2$, oder n-$MgCl_2$), n-Rohrzucker, 3 Teile n-Rohrzucker + 1 Teil n-$CaCl_2$, n/2-KCl, n/2-LiCl, n/2-NH_4Cl, n/2-RbCl, n/2-CsCl, n-$CaCl_2$, n-$SrCl_2$, n-$BaCl_2$, n-$MgCl_2$.

Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser verzögert die Gerinnung sehr stark und läßt sie unvollkommen werden. Verdünnung mit drei Teilen Wasser wirkt noch viel stärker hemmend. Verdünnung mit dem gleichen Volumen n/2-NaCl ist viel günstiger als die gleiche Verdünnung mit Wasser. Hingegen Verdünnung mit 3 Teilen n/2-NaCl ist oft nur wenig besser oder mag sogar etwas ungünstiger sein als die gleiche Verdünnung mit Wasser. Rohrzucker verhält sich im ganzen wie Wasser. Die Verdünnungen mit 3 Teilen Wasser + 1 Teil n-$CaCl_2$ oder 3 Teilen n/2-NaCl + 1 Teil n-$CaCl_2$ sind nun viel günstiger als die gleichen Verdünnungen ohne Chlorcalciumzusatz. Rohrzucker und Chlorcalcium verhält sich ungefähr wie Wasser und Chlorcalcium. Durch Zufügen von Calciumchlorid zu Wasser wird eine größere Beschleunigung der Gerinnung erzielt, als durch Mischung von Calciumchlorid mit n/2-NaCl. Durch Zufügen von Calciumchlorid zu Wasser oder n/2-NaCl wird die Gerinnung so stark beschleunigt, daß sie oft sogar schneller abläuft als in dem gewöhnlichen Hummerplasma, welches nicht mit gleichen Teilen des Verdünnungsmittels gemischt war. Seewasser wirkt etwas schlechter als Kochsalz und Chlorcalcium, das auf 52° erwärmte Serum wirkt noch ungünstiger, und wirkt nicht sehr viel besser als n/2-NaCl ohne $CaCl_2$-Zusatz. Wird Calciumchlorid in der Kombination mit Wasser durch Strontium- oder Baryum- oder Magnesiumchlorid ersetzt, so ergibt sich, daß alle drei Salze einen günstigen Einfluß auf die Blutgerinnung ausüben. Strontium- und Baryumchlorid wirken fast so stark wie Chlorcalcium. $MgCl_2$ wirkt noch etwas schwächer als $SrCl_2$ und $BaCl_2$, aber immer noch deutlich fördernd; doch kam es vor, daß $MgCl_2$ bei Verdünnung des Blutplasmas mit drei Teilen des Verdünnungsmittels nicht mehr begünstigend wirkte.

Bei Verdünnung des Hummerplasmas durch n/2-NaCl wirkt Zufügen von $SrCl_2$ und $BaCl_2$ in den angegebenen Proportionen nicht immer günstig, noch weniger $MgCl_2$. Doch können zuweilen diese Salze günstig wirken.

Verdünnt man das Hummerplasma statt mit n/2-NaCl mit n/2-LiCl, n/2-KCl, n/2-$SrCl_2$, n/2-RbCl, n/2-NH_4Cl, so ergibt sich dieselbe Reihenfolge in der hemmenden Wirkung wie oben (Nr. 9).

Verdünnt man das Hummerplasma mit gleichen Teilen n-$CaCl_2$, n-$SrCl_2$, n-$BaCl_2$, n-$MgCl_2$, so wird die Gerinnung entweder sehr stark verzögert oder aufgehoben; mit 3 Teilen dieser Lösungen auf 1 Teil Hummerplasma wird die Gerinnung aufgehoben. $MgCl_2$ wirkt hierbei sehr stark hemmend.

Wir können hieraus die folgenden Schlüsse ziehen:

1. Bei der Verdünnung des Hummerplasmas durch Wasser wird die Gerinnung dadurch geschädigt, daß in der Volumeinheit der Mischung und auf dieselbe Menge Gewebskoaguline weniger Calcium vorhanden ist.

2. Strontium, Baryum, Magnesium können bis zu einem gewissen Grade Calcium vertreten, sie wirken aber nicht ganz so stark; insbesondere wirkt Magnesium schwächer, aber doch deutlich fördernd.

3. Eine Verdünnung mit isotonischen NaCl- oder LiCl-Lösungen wirkt bis zu einem gewissen Grade günstiger wie Verdünnung mit

Wasser; wird aber die Menge der isotonischen NaCl- oder LiCl-Lösung in der Volumeinheit der Mischung noch größer, so tritt wieder stärkere Hemmung ein. Es gibt also für die unter dem Einfluß des Muskelextraktes stattfindende Gerinnung ein Optimum des Kochsalzgehaltes.

4. Dieser günstige Einfluß gewisser Mengen einer n/2-Kochsalzlösung beruht nicht auf ihrer osmotischen Wirkung, da Zuckerlösungen sich ungefähr wie Wasser verhalten, sondern er beruht auf der Wirkung des Salzes und ist vermutlich eine Ionenwirkung.

5. Wenn $CaCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$, also die Salze zweiwertiger Kationen in solchen Quantitäten (in isotonischer Lösung) zugesetzt werden, daß die Konzentration, in welcher sie günstig wirken, überschritten ist, so hemmen sie stärker als die Chloride von Natrium, Lithium, Kalium und Calcium.

6. Der Umstand, daß bei Verdünnung des Hummerplasmas mit n/2-Kochsalz durch Zusatz von Calciumchlorid eine relativ und absolut geringere Gerinnungsbeschleunigung beobachtet wird als bei Verdünnung mit Wasser und Zusatz von $CaCl_2$, beruht zum Teil wenigstens darauf, daß bei Verdünnung mit n/2-NaCl das Optimum des Calciumchloridzusatzes niedriger ist, und daß die hier angewandten Mengen von n-$CaCl_2$ dieses Optimum zum Teil überschreiten.

3 ccm HP + $^1/_4$ ccm ME (verdünnt 1 : 5): 3 Min. bis 3 Min. 13 Sek.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil H_2O) + $^1/_4$ ccm ME: 9 Min. kleine Flocken, 25 Min. etwas Fibrin am Boden, $1^3/_4$ Std. sehr geringe Gerinnung.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen H_2O) + $^1/_4$ ccm ME: 43 Min. sehr kleine Flocken, $1^3/_4$ Std. kein Fortschritt.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + $^1/_4$ ccm ME: 44 bis 47 Sek.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + $^1/_4$ ccm ME: 50 Sek. bis 1 Min.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil n-Rohrzuckerlösung) + $^1/_4$ ccm ME: 10 Min. 48 Sek. beginnende Koagulation, $^5/_4$ Std. Koagulation unvollständig.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen n-Rohrzuckerlösung) + $^1/_4$ ccm ME: 48 Min. Trübung, 1 Std. 4 Min. ein sehr kleines Koagulum am Boden.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina n-Rohrzuckerlösung + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + $^1/_4$ ccm ME: 50 Sek. bis $1^1/_2$ Min.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina n-Rohrzuckerlösung + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + $^1/_4$ ccm ME: 1 Min. 25 Sek. bis 1 Min. 55 Sek.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil n/2-NaCl-Lösung) + 1/4 ccm ME: 2 Min. 2 Sek. bis 2 Min. 12 Sek.
3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen n/2-NaCl-Lösung) + 1/4 ccm ME: 5 Min. 40 Sek. bis 8 Min. (In diesem Falle war die Verdünnung mit 3 Teilen n/2-NaCl günstiger als gewöhnlich.)

Zu den folgenden Versuchen war das ME 10fach mit Wasser verdünnt.

3 ccm HP + 1/4 ccm ME: 1 Min. 45 Sek. bis 2 Min. 25 Sek.
3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil H_2O): 8 Min. 20 Sek. bis 12 Min. 25 Sek. (unvollständige Gerinnung).
3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen H_2O): 21 Min. Flocken, 23 Min. geringe Koagulation, 36 Min. kein Fortschritt.
3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil n/2-NaCl): 2 Min. 20 Sek. bis 4 Min. 15 Sek.
3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen n/2-NaCl): 14 Min. 25 Sek. bis 24 Min. 40 Sek., unvollständig.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$CaCl_2$)]: 1 Min. 30 Sek. bis 1 Min. 55 Sek.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$CaCl_2$)]: 1 Min. 23 Sek. bis 1 Min. 58 Sek.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$SrCl_2$)]: 1 Min. 20 Sek. bis 1 Min. 50 Sek.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$SrCl_2$)]: 1 Min. 55 Sek. bis 2 Min. 45 Sek.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$BaCl_2$)]: 1 Min. 30 Sek. bis 2 Min. 12 Sek.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$BaCl_2$)]: 1 Min. 50 Sek. bis 4 Min.
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$MgCl_2$)]: 2 Min. 43 Sek. bis 4 Min. 38 Sek. (unvollständige Koagulation).
3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$MgCl_2$)]: 9 Min. 33 Sek. bis 12 Min. 3 Sek. (unvollständig).

12. Einfluß der Verdünnung des Hummerplasmas auf die unter dem Einfluß des Zellfibrinextraktes (Thrombin) stattfindende Gerinnung. Die entsprechenden Versuche wurden nun auch mit Zellfibrinextrakt angestellt. Es zeigten sich hier wieder deutliche Unterschiede zwischen dem Muskelextrakt und dem Zellfibrinextrakt. Verdünnung des Hummerplasmas mit Wasser wirkt hier, wie früher gefunden, nicht nur nicht schädlich, sondern sie beschleunigt sogar in gewissen Grenzen die Koagulation ein wenig.

In der Regel gerinnt Hummerplasma, das mit 1 oder 3 Volumina Wasser verdünnt ist, schneller als das gewöhnliche (etwas verdünnte Hummerplasma). Oft gerinnt das mit 3 Teilen Wasser verdünnte Hummerplasma ein wenig rascher als das mit 1 Teil verdünnte. Auch Verdünnung mit 1 Teil

n/2-NaCl oder Seewasser kann zuweilen die Gerinnung im Vergleich zu dem gewöhnlichen Hummerplasma etwas beschleunigen. Aber Verdünnung mit n/2-NaCl wirkt hier immer schlechter als Verdünnung mit Wasser. Es müssen daher im Hummerplasma Stoffe vorhanden sein, die hemmend auf die durch Zellfibrinextrakt bewirkte Gerinnung wirken; vielleicht wirkt die Konzentration des Fibrinogens selbst ungünstig. Verdünnung mit 3 Teilen n/2-NaCl wirkt jedoch gewöhnlich stark hemmend. n-Rohrzuckerlösungen wirken ungefähr wie Wasser, Seewasser wirkt schlechter und auf 52° erwärmtes Serum wirkt noch schlechter. Zufügen von n-$CaCl_2$ zu Wasser und Rohrzucker bewirkt in den benutzten Proportionen keine Beschleunigung der Gerinnung. Zufügen von $CaCl_2$ zu der Mischung von 3 Teilen n/2-NaCl + 1 Teil Hummerplasma befördert die Gerinnung in der Regel; auch die Gerinnung von 1 Teil Hummerplasma + 1 Teil n/2-NaCl wird in der Regel durch Zufügen von n-$CaCl_2$ gebessert; die Besserung ist aber gewöhnlich nicht sehr deutlich. Da $SrCl_2$, $BaCl_2$, $MgCl_2$ weniger stark beschleunigend wirken wie $CaCl_2$, so tritt bei diesen in den angewandten Proportionen, mit n/2-NaCl gemischt, nur die hemmende Wirkung hervor. n-$CaCl_2$, n-$BaCl_2$, n-$SrCl_2$, n-$MgCl_2$ mit Hummerplasma im Verhältnis von 1 : 1 gemischt, heben die Gerinnung auf oder hemmen sie stark; 3 Teile dieser Salze 2wertiger Kationen auf 1 Teil Hummerplasma heben die Gerinnung auf. n/2-KCl, LiCl, CsCl wirken hier ähnlich wie n/2-NaCl; NH_4Cl hemmt hier wieder sehr stark, ebenso RbCl.

Im Gegensatz zu der durch Gewebskoaguline bewirkten Gerinnung ist also ein günstiger Einfluß bei Zufügen von Calcium zu dem mit Wasser verdünnten Hummerplasma nicht zu konstatieren. Verdünnung mit Wasser wirkt sogar selbst gerinnungsbeschleunigend. Im Gegensatz zu der durch Muskelextrakt bewirkten Gerinnung ist hier Zusatz von NaCl immer schädlich im Vergleich zu Wasser. Diese Wirkung beruht nicht auf osmotischen Einflüssen, da Zuckerlösungen wie Wasser wirken, sondern es handelt sich hier wohl wieder um Ionenwirkungen. Chlorcalcium kann hingegen einen günstigen Einfluß auf die Mischung von NaCl und Hummerplasma ausüben, wenn diese Wirkung auch nicht sehr stark ist; es besteht hier also ein gewisser Antagonismus in der Wirkung von NaCl und $CaCl_2$. Wie oben festgestellt, besteht bei Zellfibrinextraktgerinnung kein großer Unterschied zwischen den einzelnen Alkalichloriden (mit Ausnahme von NH_4Cl und RbCl). Auch hier wirken wieder die Chloride der Erdalkalien viel stärker hemmend als die Alkalichloride. Es finden sich also typische Unterschiede im Verhalten der Muskelextrakte und Zellfibrinextrakte gegenüber Verdünnung des Hummerplasmas mit Wasser und in bezug auf die Bedeutung des $CaCl_2$. Zellfibrinextrakt scheint gegenüber der Entziehung von $CaCl_2$ sehr unempfindlich zu sein.

3 ccm HP + 1 ccm FiE: 46 Min. 50 Sek. bis 47 Min. 50 Min.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil H_2O) + 1 ccm FiE: 23 Min. 25 Sek. bis 26 Min.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen H_2O) + 1 ccm FiE: 20 Min. 25 Sek. bis 22 Min. 35 Sek.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil n-Rohrzuckerlösung) + 1 ccm FiE: 35 Min. 35 Sek. bis 37 Min.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen n-Rohrzuckerlösung) + 1 ccm FiE: 30 Min. 27 Sek. bis 32 Min. 20 Sek.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 1 Teil n/2-NaCl) + 1 ccm FiE: 35 Min. 35 Sek. bis 40 Min. 15 Sek.

3 ccm einer Mischung von (1 Teil HP + 3 Teilen n/2-NaCl) + 1 ccm FiE: 1 Std. bis 1 Std. 20 Min. (sehr unvollständig).

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + 1 ccm FiE: 34 Min. 20 Sek. bis 37 Min 50 Sek.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina H_2O + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + 1 ccm FiE: 26 Min. 50 Sek. bis 30 Min. 5 Sek.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina n-Rohrzuckerlösung + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + 1 ccm FiE: 34 Min. 10 Sek. bis 39 Min. 25 Sek.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina n-Rohrzuckerlösung + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + 1 ccm FiE: 53 Min. 10 Sek. bis 1 Std. 21 Min. (unvollständig).

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 1 Teil (3 Volumina n/2-NaCl + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + 1 ccm FiE: 35 Min. 50 Sek. bis 41 Min. 40 Sek.

3 ccm einer Mischung von [1 Teil HP + 3 Teilen (3 Volumina n/2-NaCl + 1 Volumen n-$CaCl_2$)] + 1 ccm FiE: 47 Min. bis 1 Std. 18½ Min.

13. Wie hängt die Stärke der durch Chlorcalciumzusatz bewirkten Beschleunigung der durch Muskelextrakt bewirkten Gerinnung von dem Verdünnungsgrade des Muskelextraktes und des Hummerplasmas ab? Wie wird das Optimum des Chlorcalciumzusatzes dadurch beeinflußt? Um vielleicht über die Bedeutung des Calciumchlorids für die Blutgerinnung etwas zu erfahren, war es von Interesse, das $CaCl_2$-Optimum für Hummerplasma in verschiedenen Verdünnungen, sowie bei verschiedenen Verdünnungen des Muskelextraktes zu bestimmen.

Es wurde jeweils zu unverdünntem oder zu dem in gewöhnlicher Weise verdünnten (20 Teile Plasma auf 14 Teile H_2O) Hummerplasma, ferner zu dem letzteren, welches durch Zusatz eines halben Volumens oder von 2 Volumen Wasser weiter verdünnt war, ¼ ccm Muskelextrakt und aufsteigend 1 Tropfen, 3 Tropfen, 0,25 ccm, 0,5 ccm, 0,75 ccm, 1 ccm oder mehr n-$CaCl_2$ gefügt.

Statt n-$CaCl_2$ wurde zuweilen auch n-$SrCl_2$ oder n-$MgCl_2$ benutzt. In anderen Fällen wurde das Hummerplasma statt mit Wasser mit n/2-NaCl-

Lösung verdünnt. Sodann wurden weitere Versuchsserien mit unverdünntem und 10fach verdünntem Muskelextrakt angestellt. Zu Parallelversuchen wurde immer dieselbe Stammlösung von unverdünntem Hummerplasma benutzt.

Es ergab sich, daß ganz unverdünntes Hummerplasma genug Calcium enthält, so daß durch Zufügen von geringen Mengen von $CaCl_2$ gewöhnlich keine Besserung herbeigeführt wird, durch Zusatz von mehr $CaCl_2$ hingegen eine Hemmung eintritt. Wahrscheinlich enthält oft sogar das Hummerplasma etwas mehr Calcium als direkt zur Optimalwirkung nötig ist. Falls Calcium schon nicht mehr günstig wirkt, wirkt Strontium und besonders Magnesium noch ungünstiger ein.

Verschiedenes Plasma von verschiedenen Tieren verhält sich nicht ganz gleichmäßig. So kann in einem Falle durch unverdünntes Muskelextrakt in unverdünntem Plasma eine, wenn auch sehr geringfügige Beschleunigung herbeigeführt werden, in einem anderen Falle bleibt auch diese aus. Mit verdünntem (1 : 10) Muskelextrakt und mit unverdünntem Hummerplasma tritt nie eine Beschleunigung ein. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß die hemmende Substanz des Muskelextraktes durch Calciumchlorid großenteils neutralisiert wird und daß diese hemmende Substanz im unverdünnten Muskelextrakt natürlich in viel größerer Menge vorhanden ist.

Prüft man das gewöhnlich benutzte Hummerplasma (20 Teile Plasma + 14 Teile H_2O), so zeigt sich hier die Verschiedenheit zwischen verschiedenen Plasmen. Es kann einmal auf Chlorcalciumzusatz nur eine geringfügige Förderung eintreten, in anderem Plasma wieder durch optimalen Chlorcalciumzusatz eine 15- bis 20fache Beschleunigung. Das gilt für unverdünntes Muskelextrakt. Verdünntes Muskelextrakt führt keine so starke Beschleunigung herbei, auch nicht bei optimalem Calciumzusatz.

Die große Mehrzahl der Versuche wurde mit Plasma angestellt, das erst in gewöhnlicher Weise mit 14 Teilen Wasser (auf 20 Teile Plasma) verdünnt war, und dann noch weiter mit dem halben oder mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt wurde. Wurde die Verdünnung mit Wasser vorgenommen, so war das Optimum des Calciumzusatzes, wenn die oben angegebenen Quantitäten der Reagenzien benutzt wurden, 0,25 bis 0,5 n-$CaCl_2$. 3 Tropfen n-$CaCl_2$ und 0,75 n-$CaCl_2$ kamen dem Optimum oft nahe. Es besteht also eine relativ große Optimumbreite für Chlorcalcium. Ein durchgreifender Unterschied bestand hierbei nicht zwischen dem mit dem halben Volumen und dem doppelten Volumen verdünnten Plasma. Mehrmals stieg bei dem letzteren die Optimalzone etwas höher als bei dem weniger verdünnten Plasma, aber das war durchaus nicht immer der Fall. Ebensowenig bestand ein direkter Zusammenhang zwischen dem Optimum für Calciumchlorid und der Verdünnung. Wurde verdünntes Muskelextrakt benutzt, so war die Empfindlichkeit gegen die höheren Calciumdosen größer, insbeson-

dere wenn noch gleichzeitig das stärker verdünnte Plasma benutzt wurde. Also die hemmenden Wirkungen größerer Chlorcalciumzusätze treten hierbei stärker zutage.

Wurde mit dem halben Volumen Wasser verdünntes Plasma benutzt, so war bei jeweiligem optimalem Chlorcalciumzusatz die Gerinnungszeit bei unverdünntem Muskelextrakt etwa fünf- bis achtmal größer, als bei Zusatz von 10fach verdünntem Muskelextrakt. Niemals war aber die Beschleunigung der stärkeren Konzentration des Muskelextraktes direkt proportional. Die Beschleunigung war niemals 10 mal größer. Das hängt wohl zum Teil wenigstens von der hemmenden Substanz im Muskelextrakt ab. Wurde das stärker verdünnte Hummerplasma benutzt, so war der Unterschied zwischen den kürzesten Gerinnungszeiten bei Gebrauch von unverdünntem und verdünntem Muskelextrakt geringer.

Bei mit dem halben Volumen Wasser verdünntem Plasma war die Förderung der Gerinnung durch Calciumzusatz bei der Zufügung von unverdünntem Muskelextrakt viel größer als bei Zufügung von verdünntem Muskelextrakt. Die Verkürzung der Gerinnungszeit auf optimalen Calciumzusatz im Vergleich zu der Gerinnungszeit ohne Calciumchloridzusatz war viel größer bei unverdünntem Muskelextrakt als bei verdünntem. Bei mit dem doppelten Volumen Wasser verdünntem Hummerplasma war dieser Unterschied zwischen verdünntem und unverdünntem Muskelextrakt nicht mehr so groß, da sich hierbei auch bei verdünntem Muskelextrakt der Einfluß des Calciums sehr stark geltend machte.

Es muß unterschieden werden zwischen einem Optimum der Geschwindigkeit der Gerinnung und einem Optimum der Masse der Gerinnung; beide fallen nicht zusammen. Das oben angegebene Optimum für Chlorcalcium bezieht sich hauptsächlich auf die Geschwindigkeit. Das Optimum für die Masse lag etwas höher. So z. B. kann die Geschwindigkeit der Gerinnung gleich groß sein bei Zusatz von 1 Tropfen und von 0,75 ccm n-$CaCl_2$; aber die Gerinnung ist viel massiger bei dem höheren Calciumzusatz. Bei Verwendung des verdünnten Muskelextraktes und bei Verwendung des stärkstverdünnten Plasmas wird sogar bei unverdünntem Muskelextrakt gewöhnlich nicht eine zusammenhängende gelatinöse Koagulation beobachtet, sondern eine schwächere, flockige. Erst bei Zusatz von 0,5 n-$CaCl_2$ oder etwas mehr kommt unter diesen Bedingungen eine gelatinöse Gerinnung zustande.

Wird statt mit Wasser das Plasma mit n/2-NaCl verdünnt, so sinkt das Optimum des Chlorcalciumzusatzes deutlich.

Bei Verdünnung des in gewöhnlicher Weise verdünnten Hummerplasmas mit dem halben Volumen n/2-NaCl sinkt das Optimum auf 3 Tropfen bis 0,25 ccm n-$CaCl_2$; bei Verdünnung mit dem doppelten Volumen n/2-NaCl sinkt es auf 1 bis 3 Tropfen. 0,75 ccm n-$CaCl_2$ wirkt hier schon deutlich hemmend, besonders bei dem stärker verdünnten Plasma. Bei Anwesenheit von Kochsalz in bestimmten Verhältnissen steigt also die Empfindlichkeit für Calciumzusatz. Wird das weniger verdünnte Plasma benutzt, so ist absolut bei

optimalem Calciumzusatz die Gerinnungszeit ebenso kurz wie bei der gleichen Verdünnung mit Wasser und optimalem Calciumzusatz. Bei dem mit dem doppelten Volumen n/2-NaCl verdünnten Plasma konnte durch optimalen Calciumchloridzusatz nicht dieselbe Gerinnungszeit erreicht werden wie bei Verdünnung mit Wasser.

Infolge dieser Empfindlichkeit für Calciumzusatz fängt auch bei höherem Calciumchloridgehalt (0,75 bis 1 ccm) die Gerinnung an, flockig zu werden. Bei Verdünnung mit n/2-NaCl ist nämlich im Gegensatz zu der Gerinnung des mit Wasser verdünnten Plasmas die Gerinnung bei den hier benutzten Proportionen (auch wenn das stärker verdünnte Plasma und das stärker verdünnte Extrakt benutzt werden) von vornherein gelatinös, statt flockig wie bei Verdünnung mit Wasser; sie wird erst flockig, wenn zuviel n-$CaCl_2$ zugesetzt wird und wenn infolgedessen eine Hemmung der Gerinnung eintritt.

Wie bei Verdünnung des Plasmas mit Wasser ist auch bei Verdünnung mit n/2-NaCl die Gerinnungsbeschleunigung geringer bei Verwendung von verdünntem Muskelextrakt als bei Verwendung von unverdünntem.

14. Wie wirkt Magnesiumchlorid auf die unter dem Einfluß von Muskelextrakt statfindende Gerinnung? Die Einwirkung von Magnesiumchlorid auf die Blutgerinnung läßt sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Magnesiumchlorid beschleunigt die unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattfindende Gerinnung unter ähnlichen Bedingungen wie Calciumchlorid, nur wirkt es stärker als $CaCl_2$, $BaCl_2$, $SrCl_2$.

2. Es neutralisiert die hemmende Substanz im Muskelextrakt, aber nicht so gut wie Calciumchlorid. Es bildet mit dieser Substanz keinen Niederschlag.

3. In gewissen Versuchen ist mehr n-$MgCl_2$ nötig als n-$CaCl_2$, um die beschleunigende Wirkung hervorzubringen; das $MgCl_2$-Optimum liegt etwas höher.

4. Wenn Chlorcalcium nicht mehr beschleunigend oder schon hemmend wirkt, wirkt Chlormagnesium hemmend oder doch stärker hemmend als Calciumchlorid. Ob in noch größeren Dosen das Magnesiumsalz stärker hemmend wirken würde als das Calciumsalz ist nicht sicher.

5. Es verhält sich im übrigen wie Calciumchlorid, es wirkt mehr beschleunigend bei unverdünntem als bei verdünntem Muskelextrakt. Am besten kann die beschleunigende Wirkung mit in

gewöhnlicher Weise hergestelltem Hummerplasma gezeigt werden, das mit dem halben Volumen Wasser verdünnt ist.

15. Wie wirkt Manganchlorid auf die unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattfindende Gerinnung? Es wurde in der früheren Mitteilung angegeben, daß bei Anwendung sehr geringer Mengen Manganchlorid dieses nicht hemmend zu wirken braucht, daß aber etwas größere Mengen hemmend wirken. Verwendet man das in gewöhnlicher Weise hergestellte (verdünnte) Plasma und verdünnt es mit dem halben Volumen Wasser, so kann, wenn in den Versuchen die üblichen Mengenverhältnisse der Reagenzien benutzt werden, 1 Tropfen n-$MnCl_2$ sogar ein wenig gerinnungsbeschleunigend wirken. Das geschieht jedoch nicht immer. 2 Tropfen führen keine Beschleunigung herbei, und mehr davon hemmen den Ablauf der Koagulation. Manganchlorid verursacht an sich einen leichten flockigen Niederschlag im Hummerplasma und es ist schwierig, diesen von einer beginnenden flockigen Fibrinbildung zu unterscheiden. Es muß hier der Ablauf der ganzen Gerinnung berücksichtigt werden.

Wie weit nun die Neutralisierung der hemmenden Substanz des Muskelextraktes bei dieser beschleunigenden Wirkung zweiwertiger Kationen in Betracht kommt, muß noch untersucht werden, etwa nachdem durch Dialyse das Muskelextrakt von der hemmenden Substanz befreit worden ist.

16. Bewirkt Calciumzusatz die Ausscheidung von vorher durch Muskelextrakt gebildetem löslichem Fibrin? Bei dem Hummerplasma läßt sich durch den Versuch entscheiden, ob der Calciumzusatz zu verdünntem Plasma in Verbindung mit Muskelextrakt nur notwendig ist, um durch Muskelextrakt vorher verändertes Fibrinogen zur Ausscheidung zu bringen, oder noch allgemeiner, ob die unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattfindende Gerinnung in zwei Phasen verläuft, so daß in der ersten das Extrakt auf das Fibrinogen unabhängig von dem Chlorcalcium einwirkt, in der zweiten Phase erst das Chlorcalcium angreift. Verwendet man verdünntes Hummerplasma (z. B. mit dem halben Volumen Wasser verdünntes gewöhnliches Plasma), so tritt je nach der Stärke des Muskelextraktes bei optimalem Calciumzusatz in einer bis wenigen Minuten (oder in weniger als einer Minute) Gerinnung ein. Ohne Calciumzusatz dauert es lange, etwa 1/2 Stunde oder mehr, bis Gerinnung eintritt. Fände die Gerinnung also in zwei Phasen statt, so müßte die Muskelextraktwirkung in einer bis wenigen Minuten beendet sein, falls Extrakt

ohne Calciumchlorid zu dem Plasma gefügt wird. Erhitzt man dann die Mischung sofort auf 52° während 25 Minuten, so wird die Wirkung des Muskelextraktes zerstört. Wäre nun die Gerinnung bis zur zweiten Phase vorgeschritten, so müßte nachträglicher Zusatz der optimalen Calciummenge Gerinnung hervorrufen, obwohl das Muskelextrakt inaktiviert ist. In mehreren Versuchen ergab sich nun, daß unter solchen Bedingungen keine typische Gerinnung eintritt, sondern nur eine Bildung von großen Flocken, die wahrscheinlich auf Agglutination kleiner, durch Hitzepräzipitation der Eiweißkörper des Muskelextraktes und Chlorcalciumzusatz hervorgerufener Flocken beruht. Fügt man nach der Erwärmung statt Calciumchlorid Muskelextrakt und Calciumchlorid zu, so findet eine deutliche Gerinnung statt; doch ist auch diese nicht so stark wie vor der Erwärmung, da das Muskelextrakt bei seiner Gerinnung vielleicht etwas Fibrinogen mit niederriß. Jedenfalls sprechen die bisher gemachten Versuche gegen die Annahme der getrennten Wirkung von Muskelextrakt und Calciumchlorid. Doch sollen noch weitere Versuche angestellt werden.

17. Widerstandsfähigkeit des Zellfibrinextraktes und des Muskelextraktes gegen schädliche Einflüsse. Schon in der vorhergehenden Mitteilung wurde angegeben, daß Muskelextrakt viel widerstandsfähiger ist als Zellfibrinextrakt. Letzteres zeigt gewöhnlich schon nach wenigen Stunden eine deutliche Wirksamkeitsabnahme, während die Muskelextrakte mehrere Tage lang ohne erhebliche Abschwächung gehalten werden konnten. Es lag die Möglichkeit vor, daß der Unterschied darauf beruhe, daß das Muskelextrakt eine Suspension von feinsten festen Teilchen darstelle, und daß die wirksamen Substanzen in dem soliden Substrat vor Zerstörung geschützt sind. Es wurden deshalb mehrfach filtrierte und verdünnte Muskelextraktlösungen auf ihre Wirksamkeitsabnahme geprüft. Solche leicht opaken Lösungen zeigen ebenfalls eine große Beständigkeit, wenn sie zum Schutz vor Fäulnis in gleicher Weise wie die Zellfibrinextraktlösungen auf Eis aufbewahrt und nur zeitweise bei Zimmertemperatur gehalten werden. Nach zwei Tagen beträgt die Wirksamkeitsabnahme gewöhnlich nicht mehr als 50 Proz., im Maximum 90 Proz.

Setzt man zu einigen (etwa 5) Cubikcentimetern Zellfibrinextrakt oder Muskelextrakt zwei Tropfen Toluol, so übt das Toluol einen merklich zerstörenden Einfluß auf das im Zellfibrinextrakt vorhandene Thrombin aus, während das Muskelextrakt nur wenig

davon beeinflußt wird. Die Gewebskoaguline sind also auch bei Wirbellosen widerstandsfähiger als das Thrombin.

18. Wird durch Zusatz von Zellfibrinextrakt zu Hummerplasma im Zusammenhang mit der stattfindenden Gerinnung neues Thrombin gebildet? Bordet und Gengou[1]) geben an, daß, wenn man verdünntes Salzplasma durch schwach wirksames Serum zur Gerinnung bringt, das nach der Gerinnung erhaltene Serum viel wirksamer ist, als das die Gerinnung verursachende. Eine solche Neubildung von Thrombin läßt sich im Hummerplasma nicht nachweisen, falls Zellfibrinextrakt zugesetzt wird.

Man bringt z. B. 15 ccm frisches Hummerplasma durch Zellfibrinextrakt zur Gerinnung. Man preßt sofort das Serum in der Kälte aus und prüft die Stärke des ausgepreßten Serums.

So findet man in einem Versuche:

3 ccm HP + 3 ccm (gewöhnliches frisches) FiE: nach 17 Min. 40 Sek. koaguliert,

3 ccm HP + 3 ccm Serum (in der oben angegebenen Weise gewonnen): nach 163 Min. koaguliert.

Dieses Serum sollte in 3 ccm 1 ccm des Zellfibrinextraktes enthalten, da zu 15 ccm Plasma 5 ccm FiE hinzugefügt worden waren. 3 ccm dieses Serums sollten also etwa 3 mal schwächer sein als das Zellfibrinextrakt. Wenn also 3 ccm Zellfibrinextrakt in 17 Minuten 40 Sekunden die Gerinnung bewirkten, sollte das Serum die Gerinnung etwa in 53 Minuten bewirken. Statt dessen brauchte das Serum 163 Minuten. Also annähernd $^3/_4$ des Zellfibrinextraktes war durch die Gerinnung unwirksam gemacht, vermutlich mit dem Koagulum niedergerissen.

Eine Neubildung von Thrombin hat also voraussichtlich nicht stattgefunden. Dieser und andere ähnliche Versuche zeigen aber auch, daß sogar, wenn schwaches Zellfibrinextrakt benutzt wird, wie in dem oben angegebenen Versuche, in dem Gerinnsel noch ein Teil des Zellfibrinextraktes (Thrombins) nachgewiesen werden kann. Ob das gewöhnliche, etwas verdünnte, erwärmte oder unverdünnte, nicht erhitzte Plasma benutzt wird, ist hierbei für den Erfolg gleichgültig.

19. Wird unter dem Einfluß des Muskelextraktes eine neue Substanz, Thrombin, gebildet? Es ist nun auf ähnliche Weise möglich, die Annahme von Morawitz und Fuld, daß Gewebsextrakte die Gerinnung dadurch beschleunigen, daß sie mit Hilfe von Calcium aus Prothrombin Thrombin produzieren,

---

[1]) Sur le pouvoir coagulant du Serum, Annales de l'Institut Pasteur 18, 1904.

durch den Versuch direkt zu prüfen. Wir sahen oben, daß sogar, wenn schwach wirksames Zellfibrin benutzt wird (3 ccm FiE brauchten fast 18 Minuten, um die Gerinnung zu bewirken), in dem ausgepreßten Serum die wirksame Substanz des Zellfibrinextraktes nachgewiesen werden kann. Nehmen wir nun Muskelextrakt, welches in der geringen Menge von $^1/_4$ ccm die Gerinnung in 1 bis 2 Minuten, oder zuweilen in noch geringerer Zeit hervorruft und, wenn es 10fach verdünnt ist, in etwa 4 bis 6 Minuten Gerinnung bewirkt, so müßte sich dieser Annahme zufolge in dem Plasma während der Gerinnung eine vielmal größere Menge Thrombin bilden, die mit Leichtigkeit in dem sofort ausgepreßten Serum nachzuweisen sein sollte, indem sie unter den dem Thrombin eigenen Bedingungen die Gerinnung bewirkt. Thrombin und Gewebskoaguline unterscheiden sich aber hauptsächlich in folgender Hinsicht:

1. Gewebskoaguline sind viel widerstandsfähiger als Thrombin.

2. Gewebskoaguline sind in höherem Grade spezifisch adaptierte Substanzen als Thrombin.

3. Gewebskoaguline wirken nur bei Anwesenheit einer bestimmten Menge von Calcium; Thrombin ist entweder ganz unabhängig von der Anwesenheit von Calcium, oder jedenfalls davon viel weniger abhängig als die Gewebskoaguline.

Infolgedessen:

a) bewirken Gewebskoaguline in stark verdünntem Hummerplasma keine oder nur eine sehr langsame Gerinnung. Thrombin wirkt hingegen in verdünntem Plasma oft sogar etwas schneller;

b) beschleunigt Calciumzusatz die Wirkung der Gewebskoaguline in verdünntem Plasma sehr stark. Thrombin hingegen wird dadurch nicht wesentlich beeinflußt;

c) Fibrinogen, in dem Calciummangel herrscht, wird durch Thrombin, aber nicht durch Gewebskoaguline ohne Zusatz von Calcium zur Gerinnung gebracht;

d) wirkt die hemmende Substanz des Muskelextraktes sehr stark auf Gewebskoaguline, nur sehr wenig auf Thrombin.

Andere weniger bedeutsame Unterschiede zwischen diesen beiden Substanzen bestehen z. B. in ihrem Verhalten gegen Kochsalz und andere Salze.

Gegen Oxalat- und Fluoridzusatz ist das Thrombin des Hummers offenbar viel empfindlicher als das Thrombin der Säugetiere. Es bestehen deshalb dem Fluoridplasma gegenüber zwischen Thrombin und Gewebskoagulin des Hummers geringe quanti-

tative, aber keine durchgreifenden Unterschiede. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Nebenwirkungen des Oxalates und des Fluorides, da, wie wir sahen, das Thrombin auch beim Hummer gegenüber Calciumentziehung wenig empfindlich ist. Auch auf Säugetierblut entwickelt ja insbesondere das Fluorid neben seiner kalkfällenden Eigenschaft sehr starke Wirkungen.

Um auf das Vorhandensein von Gewebskoagulin bzw. Thrombin zu prüfen, verwendet man am besten die unter 3 a, b, d angeführten Reaktionen.

Verwendet man 10 fach verdünntes Muskelextrakt, das in etwa 7 bis 8 Minuten die vollständige Gerinnung von Hummerplasma bewirkt, so läßt sich in dem ausgepreßten Serum überhaupt keine gerinnungsbeschleunigende Substanz nachweisen. Das etwa darin enthaltene Gewebskoagulin ist zu stark verdünnt, um wirksam zu sein. Verwendet man hingegen unverdünntes Muskelextrakt, das in etwa 2 Minuten die Gerinnung bewirkt, so kann man in dem sofort ausgepreßten Serum eine gerinnungsbeschleunigende Substanz nachweisen. Dieselbe ist aber sicher Gewebskoagulin und nicht Thrombin. Sie bringt, in entsprechender Menge dem Plasma zugesetzt, dieses ziemlich schnell zur Gerinnung, wie das bei nicht zu stark verdünntem Muskelextrakt stattfindet und wie es nur bei sehr stark wirksamem Thrombin beobachtet werden kann. Dann aber verliert diese Substanz bei Verdünnung des Plasmas sehr stark an Wirkung, wie das für das Muskelextrakt charakteristisch ist, im Gegensatz zum Thrombin. Setzt man die richtige Menge Chlorcalcium zu, so wird die Gerinnung des Plasmas stark beschleunigt; auch das ist charakteristisch für Muskelextrakt. Bei Zusatz von aus Muskelextrakt hergestellter hemmender Substanz wird die Gerinnung sehr stark verzögert, wiederum eine für das Muskelextrakt im Gegensatz zum Thrombin charakteristische Reaktion. Dies gilt ebenso für Serum, das aus vorher nicht verdünntem, nicht erhitztem Hummerplasma nach seiner unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattgefundenen Gerinnung ausgepreßt wurde, wie für auf dieselbe Weise aus dem gewöhnlichen, verdünnten Plasma gewonnenes. Es unterliegt also keinem Zweifel, daß unter dem Einfluß des Muskelextraktes kein Thrombin neugebildet wird. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß in solchen Versuchen das Muskelextrakt mit Serum gemischt verwendet wird. Serum enthält eine Reihe von (wohl meist anorganischen) Stoffen, die günstig auf die Gerinnung einwirken. Es findet daher mit diesem Gemisch von Muskelextrakt und Serum die Gerinnung etwas

schneller statt, als mit der entsprechenden Menge Muskelextrakt allein; eine ähnliche Verbesserung der Muskelextraktwirkung kann durch Zusatz von auf 52° erwärmtem und so inaktiviertem Zellfibrinextrakt in Serum bewirkt werden, oder durch Zusatz von gewöhnlichem, erwärmtem Serum. Diese kleine Verbesserung genügt aber nicht, die charakteristischen Eigenschaften des Muskelextraktes zu verwischen oder solche des Thrombins entstehen zu lassen.

Folgender Versuch, der dies ebenso wie eine Reihe anderer ähnlicher Versuche zeigt, möge ausgeführt werden. Hier tritt zugleich der Unterschied im Verhalten von Muskelextrakt und Thrombin gegenüber der im Muskelextrakt vorhandenen hemmenden Substanz deutlich hervor.

3 ccm HP + 1 ccm FiE: 21 Min. 15 Sek. koaguliert.
3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz (erhitztes, filtriertes Muskelextrakt) + 1 ccm FiE: 25 Min. bis 29 Min. koaguliert.
3 ccm HP + 1 ccm hemmende Substanz + 1 ccm FiE: 25 1/2 Min. koaguliert.
3 ccm HP + 1 ccm n/2-NaCl + 1 ccm FiE: 24 1/2 Min. koaguliert.
3 ccm HP + 2 ccm n/2-NaCl + 1 ccm FiE: 24 Min. koaguliert.
3 ccm HP + 1 ccm hemmende Substanz + 1/4 ccm ME (10fach verdünnt): 1 Std. 56 Min. keine Koagulation.
3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1/4 ccm ME (unverdünnt): 1 Std. 58 Min. keine Koagulation.
3 ccm HP + 1/4 ccm ME (unverdünnt): 2 Min. 40 Sek. koaguliert.
3 ccm HP + 1/4 ccm ME (10fach verdünnt): 6 Min. 40 Sek. bis 8 Min. 40 Sek. koaguliert.

Es wird behufs Herstellung von Serum eine größere Quantität Hummerplasma mit Muskelextrakt zur Gerinnung gebracht:

I. 30 ccm unverdünntes, nicht erhitztes Hummerplasma + 2 1/2 ccm ME (10fach verdünnt): 6 Min. 45 Sek. koaguliert.
II. 21 ccm in gewöhnlicher Weise hergestelltes Hummerplasma + 1 3/4 ccm ME (unverdünnt): 2 Min. 15 Sek. koaguliert.

Das Serum wird ausgepreßt. 3 ccm Serum sollten 0,25 ccm Muskelextrakt enthalten. Ein Teil geht aber verloren. Mit verdünntem ME gewonnenes Serum ist Serum I, mit unverdünntem ME gewonnenes Serum: Serum II.

3 ccm HP + 1 ccm Serum I: 2 1/2 Std. keine Koagulation.
3 ccm HP + 3 ccm Serum I: 2 1/2 Std. keine Koagulation.
3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1 ccm Serum I: 2 Std. 24 Min. keine Koagulation.
3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1 ccm Serum I: 2 Std. 24 Min. keine Koagulation.
3 ccm HP + 1 ccm Serum II: 4 Min. 50 Sek. bis 6 Min. 35 Sek. koaguliert.
3 ccm HP + 2 ccm Serum II: 3 Min. 45 Sek. bis 4 Min. 15 Sek. koaguliert.
3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1 ccm Serum II: 1 Std. 25 Min. keine Koagulation.
3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 2 ccm Serum II: 1 Std. 26 1/2 Min. keine Koagulation.

Diese und ähnliche andere Versuche erlauben uns aber, noch einen weiteren Schluß zu ziehen. Auch nach der besonders von Pekelharing vertretenen Anschauung ist nur eine Substanz imstande, die Gerinnung zu bewirken, nämlich das Thrombin. Dieses ist das Calciumsalz von im Blute und in den Geweben vorhandenen Nucleoproteïden. Danach sollte also das Muskelextrakt, falls es Gerinnung bewirkt, genug Calcium vorgefunden haben, so daß sich die Calciumnucleoproteïd-Verbindung bilden kann. Die hier mitgeteilten Versuche zeigen aber, daß, wenn im Hummerplasma Muskelextrakt die Gerinnung bewirkt, keine Substanz entsteht, die wie Thrombin wirkt, d. h. unabhängig von Anwesenheit des Calciums wirken kann. Vermutlich verhält es sich ähnlich mit dem Vogelplasma.

20. Sind Thrombin und Gewebskoaguline verschiedene Substanzen? In den bisherigen Versuchen wurde angenommen, daß Gewebskoaguline und Thrombin verschiedene Substanzen sind, da sie sich in vielen Beziehungen verschieden verhalten. Wir haben aber bisher keine dieser Substanzen in reiner Form dargestellt, sondern Gemische wie Muskelextrakt und Serum oder Zellfibrinextrakt benutzt. Es kann daher nur indirekt sehr wahrscheinlich gemacht werden, daß die verschiedenen Reaktionen dieser beiden Substanzen nicht auf in den Lösungen enthaltenen Beimischungen beruhen. Folgende Tatsachen sprechen nun unter anderem dafür, daß die Unterschiede nicht durch andere, beigemischte Substanzen verursacht sind: Wir sahen, daß, wenn Muskelextrakt in Hummerplasma Gerinnung hervorruft, das ausgepreßte Serum, das eine Mischung von Muskelextrakt mit sehr viel Serum darstellt, durch die Beimengung der im Serum enthaltenen Substanzen doch nicht die Eigenschaften von Thrombin annahm. Es war noch empfindlich gegen Verdünnung und seine Wirksamkeit wurde durch Calciumchloridzusatz verstärkt. Die hemmende Substanz des Muskelextraktes verhinderte die Gerinnung. Umgekehrt sahen wir, daß, wenn wir 2 ccm auf 52° erwärmtes, inaktiviertes und filtriertes Muskelextrakt zu 1 ccm Zellfibrinextrakt oder thrombinhaltigem Serum zusetzten, das Thrombin nur wenig beeinflußt wurde, obwohl jetzt eine große Menge der den Gewebskoagulinen beigemengten Substanzen dem Thrombin beigemischt wurde.

Wir können sogar eine Mischung einer geringen Menge Calciumchlorid mit Muskelextrakt und Serum (auf 52° erwärmt) herstellen, ohne daß dadurch Thrombinwirkung erzielt wird. In-

aktiviertes Zellfibrinextrakt oder Serum kann Muskelextrakt in dem Sinne verstärken wie etwa eine kleine Menge Calciumchlorid, und zwar sowohl dem Hummerplasma wie Fibrinogenlösungen gegenüber.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1 ccm FiE: 22 Min. 20 Sek. bis 27 Min. 50 Sek.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1 $^1/_2$ ccm FiE: 18 Min. 5 Sek. bis 22 Min. 40 Sek.

3 ccm HP + 2 ccm n/2-NaCl + 1 ccm FiE: 18 Min. 50 Sek. bis 25 Min. 50 Sek.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + $^1/_4$ ccm ME (10fach verdünnt): nach 3 Std. 11 Min. keine Koagulation.

3 ccm HP + $^1/_4$ ccm ME (10fach verdünnt): 4 Min. koaguliert.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + $^3/_4$ ccm Serum (inaktiviert bei 52°) + $^1/_4$ ccm ME (10fach verdünnt) + 4 Tropfen n-$CaCl_2$: 3 Std. keine Koagulation.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 3 ccm inaktiviertes Serum + 4 Tropfen n-$CaCl_2$ + $^1/_4$ ccm ME (10fach verdünnt): nach 3 Std. 11 Min. keine Koagulation.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + $^3/_4$ ccm inaktiviertes Serum + $^1/_4$ ccm ME (10fach verdünnt): nach 3 Std. keine Koagulation.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 4 Tropfen n-$CaCl_2$ + $^1/_4$ ccm ME (10fach verdünnt): nach 3 Std. keine Koagulation.

In einem anderen Versuche:

3 ccm HP + 1 ccm FiE: 5 Min. 45 Sek. bis 6 Min. 45 Sek.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 1 ccm FiE: 8 Min. 30 Sek. bis 11 Min. 40 Sek.

3 ccm HP + 2 ccm hemmende Substanz + 2 Tropfen n-$CaCl_2$ + 1 ccm FiE (inaktiviert bei 56°) + $^1/_4$ ccm ME (unverdünnt): 1 Std. 12 Min. keine Koagulation.

3 ccm HP + 2 ccm n/2-NaCl + $^1/_4$ ccm ME: 3 Min. 35 Sek. halb koaguliert, 4 Min. 15 Sek. ganz koaguliert.

Also selbst die Verbindung von Muskelextrakt mit geringen Mengen Chlorcalcium und inaktiviertem Zellfibrinextrakt kann keine Thrombinwirkung hervorrufen.

Zusammenfassung:

1. Wirksame Thrombinlösungen werden erhalten durch Auspressen des Serums nach beendeter zweiter Koagulation. Die wirksame Substanz wird aus den Blutzellen extrahiert. Nach Entfernung der Blutzellen spontan gerinnendes Hummerblut enthält nicht in nachweisbarer Menge Thrombin.

2. In auf Eis gehaltenem Blute wird weder Thrombin noch Prothrombin aus den Zellen extrahiert. Das beruht wahrscheinlich auf dem direkten Einfluß der Kälte auf die Blutzellen. Diese bleiben in der Kälte stärker kontrahiert, und die in ihnen außerhalb des Körpers vor sich gehenden Veränderungen sind sehr viel

geringer, was unter anderem dadurch zum Ausdruck kommt, daß eine viel größere Zahl der Zellgranula erhalten bleibt. Es kann ferner der Schluß gezogen werden, daß im zirkulierenden Blute Prothrombin nicht in nachweisbarer Menge vorhanden ist.

Kälte verhindert ferner die Einwirkung sowohl von Thrombin, als auch von Gewebskoagulinen, die dem Plasma zugesetzt werden.

3. Die gerinnungsbeschleunigende Substanz des Muskels wird nur langsam, die gerinnungshemmende Substanz sehr schnell extrahiert. Letztere Substanz wirkt nur sehr schwach oder gar nicht hemmend auf Thrombinlösungen und sehr stark hemmend auf Muskelextrakte (Gewebskoaguline). Sie kann daher benutzt werden, um auf die Anwesenheit dieser beiden Substanzen differentiell zu prüfen: Diese Substanz wird durch Aufkochen nicht zerstört, und ihre Wirksamkeit kann durch Calcium- oder Magnesiumchlorid zu einem großen Teile neutralisiert werden. Hemmende Substanz kommt auch in anderen Organen des Hummers und in Geweben anderer Tiere vor, aber in geringerer Menge oder in geringerer Wirksamkeit als im Hummermuskel und den Muskeln anderer, ähnlicher Tiere.

Die größere Widerstandsfähigkeit der Gewebskoaguline im Vergleich zum Thrombin zeigt sich unter anderem in ihrem Verhalten gegen Toluolzusatz.

4. Der Einfluß des Zusatzes von hemmender Substanz des Muskels oder von Natriumfluorid auf Plasma und Muskelextrakt zu verschiedenen Zeiten nach stattgehabter Mischung spricht gegen die Annahme des Ablaufes der Koagulation in zwei Perioden, deren zweite, entsprechend der Thrombinwirkung, Unempfindlichkeit gegen Ca-Mangel zeigen sollte. Eine solche Periode besteht nicht.

5. Zusatz der verschiedenen Alkalisalze beeinflußt die unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattfindende Gerinnung in etwas anderer Weise, als die unter dem Einfluß des Zellfibrinextraktes ablaufende.

6. Kleine Mengen Calciumchlorid üben keinen oder nur einen geringen beschleunigenden Einfluß auf die spontane oder auf die unter dem Einfluß des Zellfibrinextraktes stattfindende Gerinnung aus, selbst wenn im letzteren Falle das Plasma stark mit Wasser verdünnt ist.

7. Verdünnung des Hummerplasmas mit Wasser wirkt hemmend auf die Muskelextraktwirkung wegen des in der Volumeneinheit der Mischung entstehenden Ca-Mangels. Calciumchloridzusatz bewirkt starke Beschleunigung, andere zweiwertige Metalle

wie Ba, Sr, Mg können das Ca teilweise vertreten. Sogar sehr kleine Mengen von $MnCl_2$ können ein wenig beschleunigend wirken. In gewisser Konzentration beschleunigen also eine Anzahl zweiwertiger Kationen die unter dem Einfluß der Gewebskoaguline stattfindende Koagulation. Wieweit diese Beschleunigung auf Neutralisierung der hemmenden Substanz des Muskelextraktes beruht, bleibt noch zu untersuchen. Ein gewisser Gehalt an Kochsalz wirkt günstig auf die Gerinnung, welche unter dem Einfluß von Muskelextrakt stattfindet. Ein Überschuß wirkt hemmend. Die Zellfibrinextraktwirkung wird durch Kochsalzzusatz mehr gehemmt als durch Wasserzusatz. Zellfibrinextrakt ist unempfindlich gegen Verdünnung des Plasmas mit Wasser, seine Wirkung wird sogar in gewissen Grenzen dadurch beschleunigt. Calciumchloridzusatz wirkt hier nicht begünstigend. In beiden Fällen beruht die Wirkung der Salze und des Wassers nicht auf osmotischen Wirkungen, da n-Zuckerlösungen ungefähr wie Wasser wirken.

In gewissen Proportionen dem Plasma zugesetzt, wirken alle Metallsalze hemmend. Die Chloride der Alkalimetalle wirken am schwächsten, Ammoniumchlorid unter diesen am stärksten; die Erdalkalimetalle hemmen stärker, und das allein geprüfte Schwermetall ($MnCl_2$) am stärksten. Die Prüfung der meisten Schwermetallsalze ist unmöglich wegen der starken Präzipitate, die sie im Plasma bewirken. Die hemmende Wirkung ist in diesen Fällen wahrscheinlich den Kationen zuzuschreiben.

Gewebskoaguline und Thrombin verhalten sich in einem calciumarmen Plasma sehr verschieden.

8. Unverdünntes Hummerplasma besitzt so viel Calcium, daß weiterer Calciumzusatz sogar die Wirkung des Muskelextraktes nicht oder nur unwesentlich verbessert. Der optimale Calciumgehalt des Hummerplasmas beträgt etwa $8\,^1/_4$ bis $16\,^1/_2$ ccm n-$CaCl_2$ auf 108 bzw. 116 ccm Mischung, also etwas weniger als $^1/_2$ bis 1 Proz. $CaCl_2$; doch besteht hier eine sehr große Optimumbreite, so daß etwas geringerer oder größerer Chlorcalciumzusatz fast gleich gut wirkt. Eine direkte Abhängigkeit des Calciumoptimums von dem Verdünnungsgrad des Plasmas oder des Muskelextraktes ließ sich innerhalb der in diesen Versuchen benutzten Konzentrationen nicht nachweisen. Das Ca-Optimum für die Masse des gebildeten Fibrins liegt etwas höher als für die Geschwindigkeit der Gerinnung.

Bei Verdünnung des Plasmas mit n/2-NaCl anstatt mit Wasser sinkt das Optimum des Calciumzusatzes für die Muskelextraktgerinnung deutlich. Die hemmende Wirkung des Calciumchlorids tritt

bei größerer Kochsalzkonzentration früher auf, als bei Verdünnung mit Wasser.

9. Eine getrennte Wirkung von Muskelextrakt und von Calcium, etwa in der Weise, daß zuerst das Muskelextrakt das Fibrinogen verändert und in einer zweiten Phase das Calcium auf das veränderte Fibrinogen einwirkt, läßt sich durch den Versuch nicht nachweisen.

10. Während der unter dem Einfluß von Thrombinlösungen stattfindenden Gerinnung wird ein großer Teil des Thrombins unwirksam gemacht. Ein Teil desselben läßt sich jedoch in dem ausgepreßten Serum nachweisen. Eine Neubildung von Thrombin kann während der Gerinnung nicht nachgewiesen werden. Bei der unter dem Einfluß von Gewebskoagulinen stattfindenden Gerinnung bildet sich kein Thrombin. Die Gewebskoaguline bewirken die Gerinnung des Fibrinogens direkt.

11. Alle soweit beobachteten Tatsachen deuten darauf hin, daß die gerinnungsbeschleunigenden Substanzen der Gewebe und des Blutes verschieden sind, und daß erstere nicht durch Verbindung mit Calcium in eine mit den letzteren (Thrombin) identische Substanz umgewandelt werden.

VII.

Die Konstitution des Adrenalins.

Von **E. Friedmann**, Assistenten des Instituts.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Seit der Darstellung der blutdrucksteigernden Substanz der Nebennieren in kristallisiertem Zustande durch Takamine[1]) im Jahre 1901 ist die Erforschung der Konstitution des Adrenalins in raschem Fortschreiten begriffen.

Auf Grund der Analysen des kristallisierten Adrenalins stellte Takamine die empirische Formel $C_{10}H_{15}NO_3$ für das Adrenalin auf. Aldrich[2]), dem unabhängig von Takamine die Abscheidung des Adrenalins in kristallisiertem Zustande geglückt war, gab seinen Analysenwerten die Deutung $C_9H_{13}NO_3$. Abel[3]) dagegen glaubte aus seinen Analysenzahlen die Formel $C_{10}H_{13}NO_3 + {}^1/_2\,H_2O$ ableiten zu können, während v. Fürth[4]) sich auf Grund zahlreicher Analysen für die von Aldrich befürwortete Formel $C_9H_{13}NO_3$ entschied; doch betonte v. Fürth[5]) selber, daß diese Formel „noch einer etwaigen Korrektur gewärtig sein“ dürfte.

Das Verdienst, die Richtigkeit der Aldrichschen Formel $C_9H_{13}NO_3$ bewiesen zu haben, gebührt Pauly[6]) (1903). Ihre Richtigkeit wurde fernerhin bestätigt durch die Analysen von

---

[1]) J. Takamine, Society of chemical Industrie, New York (Januar 1901), Americ. Journ. of Pharmacy **73**, 523 (November 1901).

[2]) J. B. Aldrich, Americ. Journ. of Physiology 5, 457 (1. August 1901).

[3]) J. Abel, Berl. Ber. **36**, 1839 (25. Mai 1903).

[4]) v. Fürth, Sitzungsberichte d. K. Akad. d. Wiss., mathem.-naturw. Klasse, **112**, Abt. III (März 1903).

[5]) v. Fürth, l. c., ferner Biochem. Centralbl. **2**, 1 (1. November 1903), hier die ältere Literatur.

[6]) Berl. Ber. **36**, 2944 (1903).

Jowett[1]), Bertrand[2]), Stolz[3]) und Abderhalden und Bergell[4]).

Die so erbrachten analytischen Grundlagen der Formel $C_9H_{13}NO_3$ für das Adrenalin scheinen mir so sichere zu sein, daß Bedenken, wie sie noch in jüngster Zeit Abel[5]) erhoben hat, wenigstens für die Präparate, die die oben genannten Autoren analysiert haben, kaum berechtigt erscheinen.

Durch die Sicherstellung der Formel des Adrenalins war für die Erforschung der Konstitution fester Boden gewonnen. In dieser Richtung liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Keine derselben hat bisher zu einer endgültigen Entscheidung geführt. Soweit sie von kristallinischem Adrenalin als Ausgangsmaterial ausgegangen sind, sollen die sich aus ihnen ergebenden konstitutionellen Anhaltspunkte im folgenden erörtert werden.

Beim Schmelzen des Adrenalins mit Kali erhielt Takamine[6]) ein Produkt, das auf die Anwesenheit von Brenzkatechin und Protokatechusäure deutete. v. Fürth[7]) nahm die Versuche Takamines wieder auf und konnte mit Sicherheit das Auftreten von Protokatechusäure beim vorsichtigen Schmelzen des Adrenalins mit Ätzkali durch Analyse des Bleisalzes nachweisen. Da nun das reine ungespaltene Adrenalin ausgesprochene Brenzkatechinreaktionen gibt, so war im Adrenalin durch die Untersuchung von v. Fürth der Atomkomplex

```
OH/ \—C . . .
  |   |
OH\ /
```

sichergestellt.

Ferner konnte v. Fürth unter Anwendung der Methode von J. Herzig und H. Meyer feststellen, daß das Adrenalin keine Methoxylgruppe enthält, wohl aber eine Methylimidgruppe. Er erhielt diesem Befunde entsprechend bei der Einwirkung von Mineralsäuren auf Adrenalin Methylamin. Die Untersuchungen von v. Fürth klären also die Rolle von 8 Kohlenstoff-, 8 Wasser-

---

[1]) Trans. 85, 192 (1904).
[2]) Ann. Inst. Pasteur 18, 672; Bull. de la Soc. Chim. de Paris 1904, p. 1188.
[3]) Berl. Ber. 37, 4149 (31. Oktober 1904).
[4]) Daselbst 37, 2022.
[5]) Journ. of Biol. Chemistry 1, 1 (Oktober 1905).
[6]) l. c.
[7]) Monatsh. f. Chem. 24, 261 (1903).

stoff-, 2 Sauerstoffatomen und 1 Stickstoffatom auf. Es bleibt ein unbekannter Rest $C_1 H_5 O_1$.

Trotz dieser bedeutungsvollen Resultate gelangte v. Fürth nicht zu einer befriedigenden Vorstellung über die Konstitution des Adrenalins, da er, um den Analysen der durch Alkali- und Säurewirkung erhaltenen amorphen Umwandlungsprodukte des Adrenalins Rechnung zu tragen, im Adrenalin eine hydrierte Verbindung vermutete.

Auf das Unhaltbare dieser Annahme hat Pauly in der bereits erwähnten, für die Erforschung des Adrenalins grundlegenden Arbeit hingewiesen. Pauly bestätigte den Befund v. Fürths bezüglich der Abspaltbarkeit von Methylamin aus dem Adrenalin, und fügte die konstitutionell wichtige und neue Angabe den von v. Fürth ermittelten Daten hinzu, daß das Adrenalin optisch aktiv, und zwar linksdrehend ist. Das Adrenalin besitzt also ein asymmetrisches Kohlenstoffatom. Unter eingehender Berücksichtigung der vorliegenden Daten über die Konstitution das Adrenalins stellt zum ersten Male Pauly eine Reihe von Strukturformeln für das Adrenalin auf, von denen die beiden folgenden nach Pauly die größte Wahrscheinlichkeit besitzen:

I.

$$(OH)_2C_6H_3-CH(OH).CH_2.NH.CH_3$$

II.

$$(OH)_2C_6H_3-CH(NH.CH_3).CH_2.OH$$

In einer zweiten Mitteilung über das Adrenalin spricht sich Pauly[1]) zugunsten der zweiten Formel des Adrenalins aus. Es sei hervorgehoben, daß Pauly an dieser Stelle den Nachweis führt, daß das Adrenalin ein am Stickstoff vorhandenes, vertretbares Wasserstoffatom besitzt, und damit die Natur des neunten Wasserstoffatoms aufklärt[2]).

Nach den oben mitgeteilten konstitutionellen Daten besitzen beide Formeln gleich viel Wahrscheinlichkeit. Wenn trotzdem die

[1]) Berl. Ber. 37, 1388 (März 1904).

[2]) Andere Forscher wieder bevorzugen die erste Formel Paulys, so Jowett (Trans. Chem. Soc. 1904, p. 194), Stolz (Berl. Ber. 37, 4149 [1904]) und Aldrich (Journ. Amer. Chem. Soc. 27, 1074 [1904]).

einen Autoren sich für die erste Formel, andere für die zweite Formel entscheiden, so sind hierfür Befunde maßgebend, die sich nicht aus den Eigenschaften des Adrenalins ergeben, sondern aus dem Verhalten des Epinephrins, wie ich mit v. Fürth und Pauly das die Alkaloidreaktionen gebende Umwandlungsprodukt des Adrenalins nenne. Da aber von diesem Körper weder die empirische Formel sichergestellt ist, noch irgend welche klaren konstitutionellen Anhaltspunkte vorliegen, so sind diejenigen Beobachtungen, die eine intermediäre Bildung von Epinephrin aus Adrenalin nicht ausschließen, für die Konstitution des Adrenalins vorläufig, wie auch Pauly betont, nur mit größter Vorsicht zu verwerten [1]).

Seit den erwähnten Beobachtungen von v. Fürth und Pauly ist die Frage nach der Konstitution des Adrenalins durch Abbau des Adrenalins nicht wesentlich gefördert worden. Die späteren Untersuchungen bestätigen nur auf anderen Wegen die Resultate von v. Fürth und Pauly. Dies gilt für die Untersuchungen von Jowett [2]) und Stolz [3]). Stolz erhielt durch Methylierung des Adrenalins ein Reaktionsprodukt, das bei der Oxydation Veratrumsäure und bei der Spaltung mit Alkali Trimethylamin lieferte. Die Entstehung von Veratrumsäure ist der von v. Fürth nachgewiesenen Bildung von Protokatechusäure an die Seite zu stellen. Bei der Einwirkung von Jodmethyl und alkoholischem Natron auf Adrenalin erhielt Stolz ein Produkt, das er für Vanillin hielt. Die Beobachtung von v. Fürth über das Auftreten von Methylamin beim Erhitzen des Adrenalins mit Natronlauge wurde bestätigt, und das dem von v. Fürth erhaltenen Tribenzolsulfoadrenalin analoge Trichlorbenzoyladrenalin dargestellt.

Dagegen brachte die Arbeit von Stolz auf einem anderen Gebiete eine erhebliche Förderung der Adrenalinfrage. Stolz konnte nämlich synthetisch das der Formel I von Pauly entsprechende Keton, das Alkylaminoacetobrenzkatechin, darstellen.

$$(OH)_2C_6H_3—CO.CH_2.NH.CH_3$$

¹) Dieses gilt auch für die von Abel (Berl. Ber. 37, 368 [1904]) durch Einwirkung von Alkali auf Adrenalin erhaltene Base $C_8H_4N_2O$, die Abel und de M. Taveau kürzlich ausführlich beschrieben haben (Journ. of Biological Chemistry 1, 1).

²) l. c.

³) l. c.

Die pharmakologische Prüfung dieser Substanz, die Loewi und Meyer[1]) ausführten, ergab, daß dieselbe qualitativ die gleiche Wirkung hatte wie das Adrenalin selbst. Die Reduktion dieses Ketons zum entsprechenden Alkohol hätte, wenn dem Adrenalin die Formel I von Pauly zukäme, zu einem Produkt führen müssen, das mit dem Adrenalin identisch wäre. Nun scheint zwar die Reduktion des Methylaminoacetobrenzkatechins geglückt zu sein — wenigstens liegt hierüber ein Patent[2]) vor, jedoch ist es bisher weder Stolz noch Dakin[3]), der ebenfalls eine Reihe von Basen des Typus

$$(OH)_2C_6H_3-CO.CH_2.NH.R$$

darstellte, gelungen, das Reduktionsprodukt kristallinisch zu isolieren.

Diese Beobachtungen geben der Formel I von Pauly einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit. Einen chemischen Konstitutionsbeweis des Adrenalins stellen sie aber nicht dar, da der Nachweis, daß eine chemische Beziehung zwischen dem Methylaminoacetobrenzkatechin und dem Adrenalin besteht, nicht erbracht ist. Namentlich ist die pharmakologisch wie technisch wertvolle Tatsache, daß dem Methylaminoacetobrenzkatechin Adrenalinwirkungen zukommen, für die Konstitution des Adrenalins vorläufig nicht zu verwerten, da unsere Kenntnisse von dem Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung nicht gestatten, aus pharmakologischen Wirkungen einer Substanz konstitutionelle Schlüsse abzuleiten[4]).

Wie wenig zwingend übrigens die Resultate von Stolz bezüglich der Konstitution des Adrenalins sind, geht daraus hervor, daß sogar nach ihrer Veröffentlichung Abel und de M. Taveau Vorstellungen über das Adrenalin entwickeln, die mit keiner der Formeln von Pauly in Einklang zu bringen sind.

Eine Entscheidung darüber, ob eine von den beiden von Pauly für das Adrenalin aufgestellten Formeln

I.

$$(OH)_2C_6H_3-CH(OH).CH_2.NH.CH_3$$

[1]) Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 53, 213.
[2]) D. R.-P. 153300. Chem. Centralbl. 1, 315 (1905).
[3]) Proc. Chem. Soc. 21, 154.
[4]) Vgl. Schmiedeberg, Pharmakologie, S. 4 (1902).

II.

$$\text{OH}\backslash\text{OH}\,C_6H_3\text{—CH.(NH.CH}_3\text{).CH}_2\text{.OH}$$

die richtige ist, liegt also zurzeit nicht vor.

Ich habe mich bemüht, diese Entscheidung zu bringen, und über Versuche, die ich nach dieser Richtung angestellt habe, bereits in einer vorläufigen Mitteilung [1]) berichtet. Inzwischen habe ich mein Beweismaterial noch zwingender gestalten können. Die nachfolgenden Seiten sind der Vorführung desselben gewidmet.

1. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Das zu meinen Versuchen notwendige Adrenalin stellte ich mir aus 15000 Nebennieren dar. Die ersten 5000 Nebennieren wurden zu je 1000 auf Adrenalin verarbeitet, die letzten 10000 wurden auf einmal in Arbeit genommen und lieferten mir 65 g Adrenalin. Ich benutzte zu den unten zu beschreibenden Versuchen ausschließlich dieses letztere Präparat.

Als Darstellungsmethode des Adrenalins benutzte ich das Verfahren von v. Fürth.

Das Derivat des Adrenalins, von dem ich bei meinen Versuchen ausging, war das von v. Fürth [2]) dargestellte Tribenzolsulfoadrenalin, dessen Zusammensetzung nach den erhaltenen Analysen wie nach den ausgeführten Molekulargewichtsbestimmungen als gesichert angesehen werden kann.

Tribenzolsulfoadrenalin. Bei der Darstellung und Reinigung des Tribenzolsulfoadrenalins bin ich etwas anders vorgegangen als v. Fürth.

3 g Adrenalin werden mit 5 ccm Benzolsulfochlorid übergossen, 40 ccm 10 prozentiger Natronlauge hinzugefügt; das Gefäß wird leicht geschwenkt, bis das Adrenalin in Lösung gegangen ist, darauf heftig geschüttelt, bis Reaktion und Erwärmung eingetreten ist. Bei eintretender Reaktion wird das Gefäß gegen fließendes Wasser, eventuell durch hineingeworfene Eisstückchen gekühlt und nach Hinzufügen von weiteren 2 ccm Benzolsulfochlorid 10 Minuten unter Kühlung weiter geschüttelt. Nachdem der Geruch des Benzolsulfochlorids verschwunden ist, wird zum Schlusse noch 1 ccm Benzolsulfochlorid hinzugegeben und ebenfalls unter Kühlung zur Reaktion gebracht. Nach einer Einwirkung von 25 Minuten ist der Geruch des Benzolsulfochlorids verschwunden, der Geruch nach Methylamin ist deutlich wahrnehmbar. Das Reaktionsprodukt hat sich in fester Form abgeschieden.

---

[1]) Diese Beiträge 6, 91 (16. September 1904).

[2]) Sitzungsber. d. K. Akad. d. Wiss. in Wien, mathem.-naturw. Klasse, **112**, Abt. III (Mai 1903).

Die Lösung wird mit 40 ccm Wasser verdünnt und auf Eis gestellt, bis sich das gebildete Produkt abgesetzt hat. Letzteres wird durch ein Faltenfilter filtriert und mit Wasser ausgewaschen. Der vom Filter genommene lichtbraune Niederschlag wird in der Wärme in Eisessig gelöst, die Lösung abgekühlt, eine eventuell auftretende Trübung durch neuen Zusatz von Eisessig behoben und die eiskalte Flüssigkeit mit viel Wasser in dünnem Strahle versetzt. Hierbei tritt eine dichte, milchige Trübung auf, mitunter kommt es zur Ausscheidung von einigen größeren Klumpen des Reaktionsproduktes. Eine gleichmäßige Ausscheidung wird erzielt, indem man zu der durch hineingeworfene Eisstückchen gekühlten Flüssigkeit gesättigte Salzlösung hinzufügt. Hierzu eignet sich Kaliumacetat-, Zinksulfat- oder Ammonsulfatlösung. Das so ausgeflockte Reaktionsprodukt wird nach mehrstündigem Stehen in der Kälte durch ein nicht zu engmaschiges Leinwandfilter abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es bildet im trockenen Zustande ein körniges Produkt, das deutlich doppeltbrechend ist.

3 g Adrenalin lieferten 3,7 bis 4,4 g Tribenzolsulfoadrenalin. Das so erhaltene Rohprodukt war ziemlich dunkel gefärbt. Es gelang auch nicht, durch wiederholtes Lösen und Fällen oder durch Behandeln mit Tierkohle ein farbloses Präparat zu erhalten. Wohl aber konnte durch wiederholtes Erzeugen von Niederschlägen in der Lösung des Produktes der Körper in reinem und analysenfähigem Zustande gewonnen werden.

2 g Adrenalin werden in der oben geschilderten Weise in Tribenzolsulfoadrenalin übergeführt. Das Rohprodukt wird in Eisessig gelöst und mit einer Lösung von Bleiacetat in Eisessig versetzt. Die entstandene Fällung wird abfiltriert, aus dem Filtrat das überschüssige Blei durch Schwefelwasserstoff entfernt. Zu dem Filtrat vom Schwefelblei wird behufs Entfernung des Schwefelwasserstoffs eine Lösung von Bleiacetat in Eisessig zugesetzt und vom Schwefelblei abfiltriert. Das klare, schwach gelbliche Filtrat wird durch Zusatz eines Gemisches von Schwefelsäure und Eisessig von Blei befreit und aus der bleifreien Lösung durch Eintragen von Eis und Versetzen mit Wasser das Tribenzolsulfoadrenalin als schneeweißer, voluminöser, beim Stehen in der Kälte körnig werdender Niederschlag abgeschieden. Nach zweimaligem Lösen in Eisessig und Fällen mit Eiswasser wurde das Produkt untersucht.

2 g Adrenalin lieferten nach obiger Reinigung 3,3 g Tribenzolsulfoadrenalin.

Zur Analyse wurde das Präparat (I) im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1326 g Substanz lieferten 0,2593 g CO_2, entsprechend 53,39 Proz. C, und 0,0525 g H_2O, entsprechend 4,43 Proz. H.

0,2221 g Substanz gaben 5,27 ccm N (22°, 762,5 mm), entsprechend 2,67 Proz. N.

Bei einem zweiten Präparat wurden folgende Analysenwerte erhalten.

0,1055 g Substanz gaben 0,2064 g CO_2, entsprechend 53,36 Proz. C, und 0,0425 g H_2O, entsprechend 4,51 Proz. H.

Berechnet für $C_{27}H_{25}NO_9S_3$:

C	53,70 Proz.	N	2,33 Proz.
H	4,18 „	S	15,94 „

Gefunden:

Friedmann:		v. Fürth:	
C . . 53,39 und 53,36 Proz.		C . . 52,88 und 53,10 Proz.	
H . . 4,43 „ 4,51 „		H . . 4,28 „ 4,26 „	
N . . . . 2,67 „		N . . 3,14 „ 2,45 „	
		S . . . . 14,57 „	

Die zum Vergleich mitangeführten Analysen von v. Fürth zeigen Übereinstimmung mit den von mir erhaltenen Werten. Da beide Analysenreihen, wenn man die nicht deutlich kristallinische Beschaffenheit der Präparate berücksichtigt, genügende Übereinstimmung mit den berechneten Zahlen aufweisen, so darf das erhaltene Produkt als Tribenzolsulfoadrenalin angesprochen werden. Hierfür sprechen auch die von v. Fürth ausgeführten Molekulargewichtsbestimmungen. Die Löslichkeitsverhältnisse des von mir erhaltenen Produktes entsprechen den Angaben von v. Fürth. Bezüglich des Schmelzpunktes des Tribenzolsulfoadrenalins sei erwähnt, daß die Substanz bei 49° zu sintern beginnt; bei weiterem Erhitzen erweicht die Substanz und verflüssigt sich ohne scharfen Schmelzpunkt. Versuche, den Körper in gut ausgebildeten Kristallen zu gewinnen, schlugen sämtlich fehl.

Bezüglich der Konstitution des Tribenzolsulfoadrenalins ist eine von v. Fürth angestellte, aber nicht gedeutete Beobachtung wichtig. Das Produkt ist nämlich sowohl in Säuren wie in Alkalien unlöslich. Die Unlöslichkeit in Säuren beweist, daß am Stickstoff des Adrenalins kein vertretbares Wasserstoffatom mehr vorhanden ist, oder anders ausgedrückt, daß eine der drei in das Adrenalin eingetretenen Benzolsulfogruppen am Stickstoff des Adrenalins haftet. Aus der Unlöslichkeit des Produktes in fixen Alkalien kann gefolgert werden, daß die beiden anderen eingetretenen Benzolsulfogruppen die Kernhydroxyle besetzt haben. Dementsprechend gibt auch das Produkt keine Brenzkatechinreaktionen mehr.

Legt man also dem Adrenalin eine der beiden Formeln Paulys zugrunde, so kämen für das Tribenzolsulfoadrenalin folgende zwei Formeln in Betracht:

I.

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad CH_3 \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\ / \\ C_6H_5SO_2 . O\langle\ \rangle—CH(OH) . CH_2 . N—SO_2C_6H_5 \\ C_6H_5SO_2 . O \end{array}$$

II.

$$\begin{array}{l} \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad CH_3 \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\ / \\ C_6H_5SO_2 . O\langle\ \rangle—CH(N—SO_2C_6H_5) . CH_2 . OH \\ C_6H_5SO_2 . O \end{array}$$

Nach beiden Formeln müßte das Tribenzolsulfoadrenalin ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthalten, also optisch aktiv sein. Ferner müßte es nach beiden Formeln eine freie aliphatische Hydroxylgruppe enthalten. Letztere wäre nach Formel I sekundär, nach Formel II primär.

2. Nachweis eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms im Tribenzolsulfoadrenalin.

Das in der geschilderten Weise gereinigte Tribenzolsulfoadrenalin gab Lösungen, die hell genug waren, um sie im polarisierten Licht untersuchen zu können. Jedoch gelang es nicht, die spezifische Drehung für eine bestimmte Lichtart festzustellen, da die Lösungen unabhängig vom Lösungsmittel nur rote Lichtstrahlen hindurchließen. Als Lichtquelle diente ein Auerbrenner.

1,3892 g Substanz wurden in 15 ccm Chloroform gelöst, die Lösung mit Eisessig auf 25 ccm aufgefüllt und im 2 dcm Rohr untersucht. Der Ablenkungswinkel betrug — 1,68°. Hieraus berechnet sich

$$\alpha = -15{,}12^{\circ}.$$

Bei einer zweiten Bestimmung wurde ein Präparat benutzt, dessen Analysen oben (Präp. I, S. 101) mitgeteilt sind.

1,0702 g Substanz wurden zu 15 ccm in Pyridin gelöst, die Lösung mit Alkohol auf 25 ccm aufgefüllt und im 2 dm-Rohr polarisiert. Der Ablenkungswinkel betrug — 1,48°. Hieraus berechnet sich

$$\alpha = -17^{\circ}.$$

Dasselbe Präparat diente dazu, festzustellen, ob die Drehung des Tribenzolsulfoadrenalins durch mehrstündiges Erwärmen der Substanz mit Eisessig zum Verschwinden gebracht werden könnte. Diese Feststellung war für später zu beschreibende Versuche notwendig.

Das in Pyridin-Alkohol gelöste Präparat wurde mit Wasser ausgefällt, das erhaltene Produkt in Eisessig gelöst und von neuem mit Wasser abgeschieden. Zurückgewonnen wurden 0,9 g.

0,9 g wurden in 40 ccm Eisessig gelöst, die Lösung drei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und das Produkt in beschriebener Weise ausgefällt. Erhalten wurden 0,8 g.

0,7741 g Substanz wurden zu 15 ccm in Pyridin gelöst, die Lösung mit Alkohol auf 25 ccm aufgefüllt und im 2 dcm-Rohr untersucht. Der Ablenkungswinkel betrug — 0,56°. Hieraus berechnet sich

$$\alpha = -9{,}04^{0}.$$

Unter der Einwirkung des Eisessigs auf Tribenzolsulfoadrenalin war also eine Verminderung der Drehung eingetreten. Dieselbe kann im wesentlichen als eine partielle Racemisierung gedeutet werden, wenigstens zeigt die Analyse des aus der Pyridin-Alkohollösung zurückgewonnenen Produktes (Präpar. II, S. 101 u. 102) Übereineinstimmung mit den vor der Eisessigeinwirkung erhaltenen Werten.

Die mitgeteilten Versuche beweisen, daß das Tribenzolsulfoadrenalin ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält.

3. Nachweis einer freien aliphatischen Hydroxylgruppe im Tribenzolsulfoadrenalin.

Der Nachweis, daß im Tribenzolsulfoadrenalin noch eine freie Hydroxylgruppe vorhanden ist, gelang durch Acylierung des Tribenzolsulfoadrenalins mittels m-Nitrobenzoylchlorid.

1,8 g Tribenzolsulfoadrenalin werden mit 1 g m-Nitrobenzoylchlorid innig vermengt und die Mischung auf dem Wasserbade $1^1/_2$ Stunden erwärmt. Hierbei entweicht Salzsäure. Nach dem Erkalten wird die Schmelze mit heißem Alkohol übergossen, der nur einen Teil des Reaktionsproduktes aufnimmt. Der ungelöst gebliebene Anteil wird in Pyridin gelöst und mit Wasser und Natriumacetat versetzt. Das ausgeschiedene ölige Produkt wird in Eisessig aufgenommen und unter Kühlung durch Hineinwerfen von Eisstückchen mit Wasser und Natriumacetat gefällt. Das schneeweiße, körnige Produkt wird nach mehrstündigem Stehen in der Kälte abgesaugt, von neuem in Eisessig gelöst und wie oben durch Wasser gefällt. Nach zweimaligem Umfällen wurden 0,5 g erhalten.

Die Substanz ist weiß, körnig und zeigt deutliche Doppelbrechung. Beim Erhitzen im Kapillarrohr beginnt sie bei 71° zu sintern und erweicht und schmilzt zwischen 80 bis 86°.

Zur Analyse wurde das m-Nitrobenzoyltribenzolsulfoadrenalin im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1252 g Substanz gaben 0,2416 g CO_2, entsprechend 52,64 Proz. C, und 0,0419 g H_2O, entsprechend 3,74 Proz. H.

0,2124 g Substanz gaben 7,78 ccm N (20,3°, 763 mm), entsprechend 4,19 Proz. N.

Berechnet für $C_{34}H_{28}N_2S_3O_{12}$:		Gefunden:
C	53,48 Proz.	52,64 Proz.
H	3,81 „	3,74 „
N	3,79 „	4,19 „

Da das Tribenzolsulfoadrenalin nur 2,33 Proz. N enthält, das Reaktionsprodukt aber 4,28 Proz., so hat zweifellos Aufnahme einer Nitrobenzoylgruppe stattgefunden, wenn auch die Übereinstimmung der berechneten und gefundenen Werte zu wünschen übrig läßt.

Damit ist der Beweis erbracht, daß im Tribenzolsulfoadrenalin eine freie Hydroxylgruppe vorhanden ist. Ob diese Hydroxylgruppe aliphatischer Natur ist, ist aus dem mitgeteilten Versuch nicht mit Sicherheit zu schließen, geht jedoch aus folgender Überlegung hervor: Da im Adrenalin nur zwei Hydroxyle Kernhydroxyle sind und, wie oben auseinandergesetzt worden ist, im Tribenzolsulfoadrenalin diese beiden Hydroxyle durch Benzolsulfogruppen besetzt sind, so bleibt nur das Hydroxyl der Seitenkette für den Eintritt eines neuen Acyls frei, oder anders ausgedrückt, das Tribenzolsulfoadrenalin enthält eine freie aliphatische Hydroxylgruppe.

4. Über die Natur der freien aliphatischen Hydroxylgruppe im Tribenzolsulfoadrenalin.

Um zu einer Entscheidung zu gelangen, ob die im Tribenzolsulfoadrenalin nachgewiesene freie aliphatische Hydroxylgruppe sekundärer oder primärer Natur sei, bin ich von folgender Überlegung ausgegangen. Bei Betrachtung der beiden für das Tribenzolsulfoadrenalin in Betracht kommenden Formeln

I.

$$\begin{matrix} C_6H_5SO_2.O \\ C_6H_5SO_2.O \end{matrix} \rangle C_6H_3 - CH(OH).CH_2.N\begin{matrix} CH_3 \\ SO_2C_6H_5 \end{matrix}$$

II.

$$\begin{matrix} C_6H_5SO_2.O \\ C_6H_5SO_2.O \end{matrix} \rangle C_6H_3 - CH(N\begin{matrix} CH_3 \\ SO_2C_6H_5 \end{matrix}).CH_2.OH$$

ergibt sich, daß die Hydroxylgruppe in Formel I am asymmetrischen Kohlenstoff gebunden ist, in Formel II dagegen nicht. Ein Tribenzolsulfoadrenalin nach Formel I müßte daher bei der Oxydation ein inaktives Keton liefern, nach Formel II einen optisch aktiven Aldehyd und bei weiterer Oxydation eine optisch aktive Säure.

A. Oxydation des Tribenzolsulfoadrenalins.

Die Oxydation des Tribenzolsulfoadrenalins habe ich in Eisessiglösung mittels Chromsäure ausgeführt.

Vorversuche, die mit berechneter Menge Chromsäure ausgeführt waren (3 Mol. Tribenzolsulfoadrenalin auf 2 Mol. Chromsäure) ergaben, daß diese Menge nicht genügte. Im Reaktionsgemenge war unverändertes Tribenzolsulfoadrenalin nachzuweisen. Dagegen führte die Oxydation mit einem Überschuß von Chromsäure zum Ziel. Hieraus den Schluß zu ziehen, daß das Tribenzolsulfoadrenalin eine andere Konstitution besitzt als die bereits diskutierte, scheint mir nicht statthaft. Vielmehr ist zu berücksichtigen, daß das Tribenzolsulfoadrenalin nicht durch Kristallisation, sondern durch Fällung gewonnen ist und nach seiner Darstellung leichter oxydierbare Verunreinigungen einschließen kann.

Bei der Oxydation wurde zu Anfang wie folgt verfahren.

I. Versuch.

2,4 g Tribenzolsulfoadrenalin werden in 10 ccm sorgfältig gereinigten Eisessigs gelöst. Hierzu werden 0,5 g Chromsäure, die ich an der Luft zerfließen ließ und darauf in 30 ccm Eisessig löste, hinzugefügt. Beim Vermischen der Lösungen tritt sofort eine bräunliche Fällung auf. Das Reaktionsgemenge wird bei 70 bis 80° gehalten. Nach einer Viertelstunde ist die zu Anfang entstandene Fällung in Lösung gegangen, nach einer halben Stunde ist die Chromsäure verbraucht. (Geprüft wurde auf Chromsäure durch Überführung in Überchromsäure.) Die Flüssigkeit wird von neuem mit 0,2 g Chromsäure versetzt, die wieder nach einer Stunde verbraucht ist. Es wird jetzt noch einmal 0,2 g Chromsäure hinzugegeben und die Temperatur auf 80 bis 90° gesteigert. Nach einer weiteren Stunde ist deutlich freie Chromsäure nachweisbar und die Oxydation somit beendet.

Nach völligem Erkalten wird die Reaktionsflüssigkeit in 200 ccm Wasser gegossen. Dabei tritt eine dichte milchige Trübung auf. Das Oxydationsprodukt fällt nur zum Teil als voluminöser weißer Niederschlag aus. Erst nach Zusatz kalt gesättigter Natriumacetatlösung findet völlige Abscheidung statt. Nach zweistündigem Stehen im Eisschrank ist das Produkt körnig geworden und zeigt deutliche Doppelbrechung. Es wird abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Nach dreimaligem Lösen in Eisessig und Fällen mit Wasser wurden 1,8 g Oxydationsprodukt erhalten.

Das Produkt ist spielend löslich in Aceton, Chloroform und Pyridin, in Benzol und Essigäther schwer löslich in der Kälte, leicht löslich in der Wärme, mäßig löslich in heißem Alkohol, unlöslich in Äther, Petroläther und Wasser. Es besitzt keinen scharfen Schmelzpunkt.

Die Substanz ist unlöslich in Säuren und Alkalien.

Bei der Analyse der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz wurden folgende Zahlen erhalten.

0,1226 g Substanz gaben 0,2422 g CO_2, entsprechend 53,88 Proz. C, und 0,0459 g H_2O, entsprechend 4,18 Proz. H.

0,2123 g Substanz gaben 5,17 ccm N (18,3°, 762 mm), entsprechend 2,81 Proz. N.

Die Analysen stimmen zu den Werten, die sich für das dem Tribenzolsulfoadrenalin entsprechende Keton berechnen.

Berechnet für $C_{27}H_{23}NS_3O_9$		Gefunden:
C	53,87 Proz.	53,88 Proz.
H	3,85 „	4,18 „
N	2,34 „	2,81 „

Ich habe dieses Produkt Tribenzolsulfoadrenalon genannt.

Bei einem Versuch, die spezifische Drehung des Tribenzolsulfoadrenalons zu bestimmen, ergab sich, daß das Produkt optisch inaktiv war.

Der Versuch wurde zweimal mit Präparaten verschiedener Darstellung in einer Lösung von Pyridin-Alkohol angestellt; bei dem ersten Versuch kamen 1,2413 g Substanz zur Prüfung, bei dem zweiten Versuch 0,6772 g Substanz.

Zum Nachweis des Ketoncharakters des Tribenzolsulfoadrenalons habe ich versucht, das Tribenzolsulfoadrenalon mit p-Nitrophenylhydrazin zur Reaktion zu bringen.

Es gelang zwar im Gegensatz zu dem Verhalten des Tribenzolsulfoadrenalins, ein Hydrazon vom Tribenzolsulfoadrenalon darzustellen, jedoch wurden bei der Analyse des Hydrazons weder untereinander noch zu den berechneten Werten stimmende Zahlen erhalten.

Der zur Gewinnung des p-Nitrophenylhydrazons des Tribenzolsulfoadrenalons eingeschlagene Weg war der folgende.

1 g Tribenzolsulfoadrenalon und 0,25 g p-Nitrophenylhydrazin werden zusammen fein gepulvert, und die Mischung wird nach Zusatz eines Tropfens Eisessig auf dem Wasserbade erwärmt. Es bildet sich eine gleichmäßige rotbraune Schmelze. Nach einer Stunde wird die Schmelze in Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit Eisessig im Überschuß versetzt und die Lösung nach mehrstündigem Stehen im Eisschrank in Eiswasser gegossen. Hierbei

fällt das Produkt als voluminöser gelber Niederschlag aus. Nach 12 stündigem Stehen im Eisschrank wird es abgesaugt, mit verdünnter Essigsäure ausgewaschen, von neuem in Eisessig und mit Wasser gefällt. Nach zweimaligem Lösen und Fällen wird 1 g Reaktionsprodukt erhalten.

Das Produkt ist gelb gefärbt. Es ist unlöslich in Wasser, Äther und Petroläther, schwer löslich in Äthylalkohol, gut löslich in Eisessig, spielend löslich in Pyridin und Chloroform. Beim Erhitzen verändert sich die Substanz bei 54°, erweicht und schmilzt bei 55 bis 65°.

Zur Analyse wurde der Körper im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1119 g Substanz gaben 0,2167 g CO_2, entsprechend 52,82 Proz. C, und 0,0447 g H_2O, entsprechend 4,47 Proz. H.

0,1254 g Substanz gaben 0,2514 g CO_2, entsprechend 54,68 Proz. C, und 0,0458 g H_2O, entsprechend 4,09 Proz. H.

0,1872 g Substanz gaben 10,18 ccm N (16,5°, 764,5 mm), entsprechend 6,40 Proz. N.

0,1714 g Substanz gaben 8,53 ccm N (21,8°, 764 mm), entsprechend 5,81 Proz. N.

Berechnet für $C_{33}H_{28}N_4S_3O_{10}$:		Gefunden:	
C	53,84 Proz.	52,82 Proz.	54,68 Proz.
H	3,70 „	4,47 „	4,09 „
N	7,64 „	6,40 „	5,81 „

Die eben geschilderte Versuchsreihe gestattet bezüglich des Tribenzolsulfoadrenalons keine bindenden Schlüsse. Wohl deuten die Unlöslichkeit des Produktes in Alkali, seine relative Beständigkeit gegen überschüssige Chromsäure, seine optische Inaktivität, sowie seine Reaktionsfähigkeit mit Nitrophenylhydrazin darauf hin, daß es als das dem Tribenzolsulfoadrenalin entsprechende Keton aufzufassen ist. Da aber diese Auffassung die Konstitution des Adrenalins entscheiden würde, so ist es zweifellos erforderlich, hierfür den Beweis an gut kristallisiertem und chemisch scharf charakterisiertem Material zu erbringen. Ich habe mich daher in einer zweiten Versuchsreihe bemüht, das Tribenzolsulfoadrenalon in gut ausgebildeten Kristallen zu gewinnen und seinen Ketoncharakter an einem kristallinischen Derivat zu beweisen. Unter Übergehung der zahlreichen, mühseligen Vorversuche, die ich zu diesem Zweck angestellt habe, will ich zur Beschreibung derjenigen Versuche übergehen, die mich zu dem erstrebten Ziele geführt haben.

II. Versuch.

4 g Tribenzolsulfoadrenalin werden in 20 ccm Eisessig gelöst und mit 1,5 g Chromsäure in 20 ccm Eisessig zwei Stunden auf dem Wasserbade

erwärmt. Nach dieser Zeit wird die Reaktionflüssigkeit abgekühlt, in 300 ccm Wasser gegossen und das ausgeschiedene Produkt nach 12stündigem Stehen im Eisschrank abgesaugt. Das so erhaltene Produkt wird mit 10 ccm 5prozentigem Ammoniak auf dem Wasserbade fünf Minuten erwärmt und der milchige ammoniakalische Auszug von dem öligen Rückstande abgegossen. Nachdem die Behandlung mit Ammoniak noch einmal in der gleichen Weise wiederholt worden ist, wird der ölige Rückstand mit kaltem Wasser übergossen. Dabei erstarrt er augenblicklich. Nach zweimaligem Lösen in Eisessig und Fällen mit Wasser wird das erhaltene Rohprodukt im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Seine Menge beträgt 3 g. 6 g Rohprodukt werden in 12 ccm Eisessig gelöst und die Lösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit hat sich eine geringe Menge amorpher Substanz abgeschieden, die abfiltriert wird. Das klare Filtrat wird in einem verschlossenen Erlenmeyerkölbchen, dessen Wände und dessen Boden mit einem scharfen Glasstab geritzt sind, im Eisschrank aufbewahrt. Nach acht Tagen beginnt die Kristallisation und nimmt nur langsam zu. Nach einem Monat wird das Kölbchen aus dem Eisschranke herausgenommen. Die ausgeschiedenen Kristalle, die fest am Boden des Gefäßes haften, werden abgesaugt, mit wenig Eisessig nachgewaschen, mit absolutem Alkohol ausgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

6 g Rohprodukt lieferten 1,3 g kristallinisches Tribenzolsulfoadrenalon, 5 g Rohprodukt, in derselben Weise behandelt, lieferten 0,9 g kristallinisches Tribenzolsulfoadrenalon.

Die so erhaltene Substanz hatte noch keinen scharfen Schmelzpunkt, derselbe lag bei 86 bis 94°. Jedoch gelang es, durch einmaliges Umkristallisieren aus absolutem Alkohol zu einem Produkt mit scharfem und konstantem Schmelzpunkt zu gelangen.

1,3 g aus Eisessig kristallisiertes Tribenzolsulfoadrenalon werden in 60 ccm siedenden Alkohols gelöst. Beim Erkalten scheidet sich ein Teil des Produktes ölig aus. Nachdem sich die ölige Substanz abgesetzt und die Flüssigkeit Zimmertemperatur angenommen hat, wird die klare alkoholische Lösung von der öligen Ausscheidung abgegossen. Es beginnt sehr rasch in der abgegossenen Flüssigkeit eine Kristallisation von prachtvollen, mehrere Millimeter langen Nadeln, die zu Drusen vereint sind. Nach acht Tagen ist die Kristallisation beendet. Die ausgeschiedenen Kristalle werden abgesaugt, mit Alkohol ausgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Ihre Menge beträgt 0,5 g. Die beim Erkalten der alkoholischen Lösung erhaltene ölige Ausscheidung wird von neuem in Alkohol gelöst und liefert 0,4 g desselben Produktes in ebenso schön ausgebildeten Kristallen.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die Analyse wurde nach Dennstedt ausgeführt. Zur gleichzeitigen Ausführung der Schwefelbestimmung wurde das Bleisuperoxyd mit 200 ccm Sodalösung behandelt und filtriert und, um das Auswaschen des Filters zu sparen, in 192 ccm der Schwefelgehalt bestimmt.

0,1866 g Substanz gaben 0,3712 g CO_2, entsprechend 54,24 Proz. C, und 0,0702 g H_2O, entsprechend 4,18 Proz. H.

0,1866 g Substanz = 200 ccm; 192 ccm, entsprechend 0,1791 g Substanz, gaben 0,2092 g $BaSO_4$, entsprechend 16,04 Proz. S.

0,2603 g Substanz gaben 5,8 ccm N (12°, 756 mm), entsprechend 2,62 Proz. N.

Aus den erhaltenen Analysen geht hervor, daß der erhaltene Körper Tribenzolsulfoadrenalon ist.

Berechnet für $C_{27}H_{23}NS_3O_9$:		Gefunden:
C	53,87 Proz.	54,24 Proz.
H	3,85 „	4,18 „
N	2,34 „	2,62 „
S	15,99 „	16,04 „

Der Schmelzpunkt des Tribenzolsulfoadrenalons liegt scharf zwischen 106 bis 107°. Die Kristalle stellen große, mehrere Millimeter lange rhombische Spieße dar. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigen die einzelnen Kristalle senkrecht zur Längsrichtung zahlreiche scharfe, feine Querlinien, die auf Spaltbarkeit der Kristalle deuten. Im Polarisationsmikroskop untersucht, zeigen sie Lichtauslöschung in der Längsrichtung bei Einstellung der einzelnen Kristalle ihrer Längsachse nach parallel zu einem der Schenkel des Fadenkreuzes.

Die Substanz ist unlöslich in Säuren und Alkalien. Sie ist spielend löslich in Aceton, Chloroform und Pyridin. In Benzol und Essigäther sind die Kristalle schwer löslich in der Kälte, leicht löslich in der Wärme. Sie sind mäßig löslich in heißem Alkohol, leicht löslich in heißem Eisessig, unlöslich in Äther, Petroläther und Wasser.

Eine Lösung der Kristalle in Eisessig gibt, mit Wasser versetzt eine dichte, milchige Trübung, zum Teil einen voluminösen, weißen Niederschlag, der beim Stehen körnig und doppelbrechend wird und identisch mit dem oben beschriebenen, körnigen Tribenzolsulfoadrenalon ist.

Das kristallinische Tribenzolsulfoadrenalon ist ebenso wie das amorphe optisch inaktiv.

Versuche, das Tribenzolsulfoadrenalon aus einem anderen Lösungsmittel als Eisessig zur Kristallisation zu bringen, hatten keinen Erfolg, vielmehr scheint das Produkt erst aus Eisessig kristallisieren zu müssen, um dann aus Alkohol umkristallisiert werden zu können.

Das Tribenzolsulfoadrenalon reagiert nicht mit m-Nitrobenzoylchlorid.

Der Nachweis der Carbonylgruppe im Tribenzolsulfoadrenalon gelang durch Darstellung des prächtig kristallinischen p-Nitrophenylhydrazons.

0,6 g Tribenzolsulfoadrenalon vom Schmelzpunkt 106 bis 107° werden in 35 ccm heißen Alkohols gelöst und mit 0,15 g p-Nitrophenylhydrazin in 15 ccm Alkohol in der Wärme versetzt. Das Reaktionsgemisch wird zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Beim langsamen Erkalten scheidet sich zuerst eine geringe Menge einer öligen Substanz aus, von der nach völligem Erkalten abgegossen wird. Aus der abgegossenen klaren, goldgelben Mutterlauge kristallisiert nach vierzehntägigem Stehen bei Zimmertemperatur (durchschnittlich 20°) das gesuchte Nitrophenylhydrazon aus. Eine Abkühlung der Flüssigkeit habe ich sorgfältig vermieden, da bei einem Versuche, wo ich die Flüssigkeit zu Beschleunigung der Kristallisation in den Eisschrank stellte, trotz Anwesenheit von zahlreichen Kristallen des Nitrophenylhydrazons, die Substanz sich sehr rasch ölig ausschied. Nach Umkristallisieren aus Alkohol wurden 0,4 g analysenreines Material erhalten.

Der Schmelzpunkt des p-Nitrophenylhydrazons liegt bei 174 bis 175°.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1086 g Substanz gaben 7,50 ccm N (22°, 750 mm), entsprechend 7,76 Proz. N.

Berechnet für $C_{33}H_{28}N_4S_3O_{10}$:	Gefunden:
N . . . 7,64 Proz.	7,76 Proz.

In meiner vorläufigen Mitteilung über das Adrenalin habe ich angegeben, daß bei weiterer Oxydation des Tribenzolsulfoadrenalons eine Substanz erhalten wird, die ich Tribenzolsulfoperadrenalon genannt habe, und von der ich vermutete, daß sie möglicherweise ein substituiertes Säureamid sei. Diese Vermutung hat sich bei weiterer Untersuchung nicht bestätigt. Vielmehr ist die Substanz ein Gemisch von Tribenzolsulfoadrenalon und einem Körper, der wahrscheinlich dimolekular ist und vermutlich durch Zusammentritt zweier Tribenzolsulfoadrenalonmoleküle unter Austritt eines Methylaminrestes entstanden ist.

Ich habe die Substanz auf folgende Weise erhalten.

4,4 g Tribenzolsulfoadrenalin werden in 20 ccm Eisessig gelöst, mit 2,5 g Chromsäure in 30 ccm Eisessig versetzt und die Lösung zwei Stunden auf dem Wasserbade erwärmt. Das Oxydationsprodukt wird mit Wasser ausgefällt und durch zweimaliges Lösen in Eisessig und Fällen mit Wasser und Zinksulfat gereinigt. Seine Menge beträgt 3,3 g. Dieses Produkt wird in wenig Eisessig in der Wärme gelöst und drei Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dabei scheiden sich reichlich schön ausgebildete Nadeln aus. Sie werden abgesaugt und mit wenig Alkohol ausgewaschen. Ihre Menge beträgt 1,5 g. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 188 bis 189°. Zu ihrer weiteren

Reinigung werden sie in 40 ccm Alkohol gelöst und Wasser bis zur bleibenden milchigen Trübung in der Wärme hinzugefügt. Nachdem sich das hierbei ausfallende Öl abgesetzt hat, wird filtriert und das Filtrat mit viel Wasser versetzt. Aus der opaken Lösung kristallisiert das Produkt in schönen Nadeln allmählich aus. Nach zweitägigem Stehen wird es abgesaugt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Seine Menge beträgt 0,5 g.

Das Produkt schmilzt scharf zwischen 196 bis 197° und ändert seinen Schmelzpunkt bei weiteren Reinigungsversuchen nicht mehr. Im Gegensatz zum Tribenzolsulfoadrenalon löst es sich in Ammoniak, jedoch gelang es nicht, klare ammoniakalische Lösungen zu erzielen. Selbst nach mehrfacher Filtration durch Kitasatokerzen war die ammoniakalische Lösung stets trübe.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die Analyse von Präparat II wurde nach Dennstedt ausgeführt.

Präparat I.

0,1319 g Substanz gaben 0,2524 g CO_2, entsprechend 52,19 Proz. C, und 0,0456 g H_2O, entsprechend 3,87 Proz. H.

0,2167 g Substanz gaben 2,18 ccm N (18,9°, 758,8 mm), entsprechend 1,16 Proz. N.

Präparat II.

0,1426 g Substanz gaben 0,2685 g CO_2, entsprechend 52,30 Proz. C, und 0,0483 g H_2O, entsprechend 3,77 Proz. H.

0,1426 g Substanz = 200 ccm; 190 ccm = 0,1354 g Substanz gaben 0,1482 g $BaSO_4$, entsprechend 15,03 Proz. S.

0,1915 g Substanz gaben 2,2 ccm N (12°, 752 mm), entsprechend 1,33 Proz. N.

0,1713 g Substanz gaben 1,5 ccm N (15°, 760 mm), entsprechend 1,01 Proz. N.

Gefunden:

C	H	N	S	
52,19	3,87	1,16	—	Präparat I
52,30	3,77	1,33	15,03	Präparat II
—	—	1,01	—	Präparat II

Der Stickstoffgehalt des Präparates ist etwa halb so groß wie der des Tribenzolsulfoadrenalons (2,34 Proz.) und weist darauf hin, daß hier eine komplizierte Verbindung vorliegt. Ich bin mit der weiteren Aufklärung derselben beschäftigt.

Die mitgeteilten Versuche beweisen, daß im Tribenzolsulfoadrenalon die Carbonylgruppe vorhanden ist. Da es nicht gelungen ist, das Tribenzolsulfoadrenalon zu einer Säure derselben Kohlenstoffzahl zu oxydieren, so muß die Carbonylgruppe im Tribenzolsulfoadrenalon eine Ketongruppe sein. Da bei der Bildung dieser Ketongruppe das im Tribenzolsulfoadrenalin nachgewiesene asymmetrische Kohlenstoffatom seine Asymmetrie eingebüßt hat, und ferner das Tribenzolsulfoadrenalon keine freie Hydroxylgruppe mehr

enthält, so folgt daraus, daß bei der Oxydation des Tribenzolsulfoadrenalins zum Tribenzolsulfoadrenalon die Gruppe —CH(OH)— in die Gruppe —CO— übergeführt ist.

Daraus ergibt sich in zwingender Weise die Konstitution des Tribenzolsulfoadrenalins und die des Tribenzolsulfoadrenalons als die folgende:

$$
\begin{array}{l}
C_6H_5 . SO_2 . O \\
C_6H_5 . SO_2 . O
\end{array}
\!\!\!\; C_6H_3 — CH(OH) . CH_2 . N(CH_3) — SO_2 . C_6H_5
$$

Tribenzolsulfoadrenalin.

$$
\begin{array}{l}
C_6H_5SO_2 . O \\
C_6H_5SO_2 . O
\end{array}
\!\!\!\; C_6H_3 — CO . CH_2 . N(CH_3) — SO_2 . C_6H_5
$$

Tribenzolsulfoadrenalon.

Ich habe diesen Beweis der Konstitution des Adrenalins durch die Synthese des Tribenzolsulfoadrenalons zu stützen versucht.

B. Synthese des Tribenzolsulfoadrenalons.

1. Adrenalon[1]).

Zur Darstellung des Methylaminoacetobrenzkatechins[2]) bin ich ebenso wie die Höchster[3]) Farbwerke und F. Stolz[4]) von dem von Dziergowski[5]) dargestellten Chloracetobrenzkatechin aus-

[1]) Bezüglich der Priorität der Darstellung des Adrenalons bin ich genötigt, Stellung zu nehmen, da meine am 16. September 1903 in diesen Beiträgen veröffentlichte Mitteilung dahin gedeutet worden ist, als ob ich hinsichtlich des Adrenalons oder des leitenden Gedankens, der zu seiner Synthese geführt hat, eine Priorität beansprucht hätte. Der Sachverhalt ist vielmehr folgender: Ich habe meine Versuche über den Abbau des Adrenalins, ebenso wie die Versuche zur Synthese seiner Abbauprodukte zu einer Zeit begonnen, wo überhaupt noch kein Patent von seiten der Höchster Farbwerke vorlag. Als ich Herrn Dr. v. Fürth von meinen Versuchen über die Umsetzung von Chloracetobrenzkatechin mit Methylamin erzählte, teilte mir Herr Dr. v. Fürth mit, daß er vertraulich von seiten der Höchster Farbwerke von Versuchen, dieselbe Umsetzung betreffend, unterrichtet worden wäre. Aus Rücksicht darauf habe ich daher meine Versuche nicht eher veröffentlicht, als bis genauere Mitteilungen über die Darstellung und Wirkung des Methylaminoacetobrenzkatechins vorlagen. In dem Patentreferat der Höchster Farbwerke vom 20. Juli 1903 des Chemischen Centralblattes wurde die Darstellung des kristallisierten Methylaminoacetobrenzkatechins beschrieben, eine Darstellung, die mir aus eigenen Versuchen bereits bekannt war. Am 30. August 1903 teilte Hans Meyer in der

gegangen. Da ich etwas anders als der letztgenannte Autor gearbeitet habe, so gebe ich die von mir benutzte Darstellungsweise des Methylaminoacetobrenzkatechins wieder.

20 g Chloracetobrenzkatechin werden in Portionen zu 4 g in einer Reibschale mit je 9 ccm 33 prozentigem Methylamin übergossen. Das gebildete Methylaminsalz wird fein gepulvert, darauf die Reibschale für wenige Minuten auf ein lebhaft siedendes Wasserbad gestellt und, sobald die Reaktionsmasse teigige Konsistenz angenommen hat, in die Kälte gestellt. Die erhaltene Masse ist erstarrt; sie wird mit je 9 ccm Wasser angerührt, das Reaktionsprodukt abgesaugt, darauf mit je 40 ccm Alkohol ausgewaschen und der Alkohol durch Äther fortgespült. Aus 20 g Chloracetobrenzkatechin wurden 12 g eines schwach gefärbten, kristallinischen Pulvers erhalten.

Zur Reinigung dieses Rohproduktes habe ich es ebenso wie F. Stolz in das gut kristallisierende Chlorhydrat übergeführt und aus dem Chlorhydrat die freie Base mit Ammoniak abgeschieden.

5 g Rohprodukt werden in eine heiße Mischung von 5 ccm konzentrierter Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) und 25 ccm Alkohol eingetragen. Beim Erkalten kristallisieren 4,5 g Chlorhydrat in langen sechsseitigen Plättchen aus. Sie werden abgesaugt und mit Alkohol und Äther ausgewaschen. Nach nochmaligem Umkristallisieren aus 5 Tln. verdünnten Alkohols (1 Tl. Wasser, 3 Tle. Alkohol) werden 2,7 g eines schneeweißen Präparates gewonnen.

Sitzung des Internationalen Physiologenkongresses Versuche mit, aus denen hervorging, daß das Methylaminoacetobrenzkatechin qualitativ die gleiche Wirkung wie das Adrenalin hat. Auch diese Tatsache war mir aus eigenen Versuchen bekannt. Da nach Veröffentlichung dieser Resultate der Gedankengang, der mich bei meinem Versuche leitete, möglicherweise auch von anderen verfolgt werden konnte, so entschloß ich mich zur Mitteilung meiner Versuche und datierte, um den Anschein eines Prioritätsanspruches zu vermeiden, meine vorläufige Mitteilung vom 16. September. Leider unterließ ich, die erwähnten Arbeiten zu zitieren, weil ich der Meinung war, daß sie als ein Gegenstand berechtigten, allgemeinen Interesses bereits weiteren Kreisen geläufig waren. Diese Unterlassung veranlaßte Herrn Professor Hans Meyer (Centralbl. f. Physiol. 18, 501) zu der Bemerkung, daß Untersuchungen, die mit meinen Angaben in nächster Berührung stehen, schon seit längerer Zeit von F. Stolz in dem unter Leitung von W. Roser stehenden Laboratorium der Höchster Farbwerke und von ihm selber „ausgeführt und in den wesentlichen Punkten auch bereits veröffentlicht worden sind". Demgegenüber kann ich nur auf obigen Sachverhalt und namentlich auf den prinzipiellen Unterschied hinweisen, der bei der Ermittelung der Konstitution eines Körpers zwischen fruchtbaren Ideen und zwingenden Beweisstücken nun einmal besteht. Ich glaube den Verdiensten von Stolz und H. Meyer nicht nahe zu treten, wenn ich der Meinung bin, daß diese zwingenden Beweisstücke erst in vorliegender Arbeit beigebracht werden.

[2]) Vgl. die Zusammenstellung der 1904 über das Adrenalin erschienenen Arbeiten in den Ann. Reports of the Progr. of Chemistry I, p. 171.

[3]) Chem. Centralbl. 1904, II, S. 270.

[4]) Berl. Ber. 37, 4152.

[5]) Bull. de la Soc. Chim. 1894, T. XII, p. 807.

Das so erhaltene Chlorhydrat hat den Schmelzpunkt 243 bis 244°.

Zur Abscheidung des freien Methylaminoacetobrenzkatechins wird das Chlorhydrat in der vierfachen Menge Wasser gelöst und mit 10 prozentigem Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Beim Reiben des Gefäßes mit einem scharfen Glasstabe kristallisiert die Base in schweren, farblosen Drusen aus.

Der Zersetzungspunkt des reinen Methylaminoacetobrenzkatechins liegt bei 235 bis 236°. Ich habe diesen Körper in meiner vorläufigen Mitteilung Adrenalon genannt.

Zur Analyse wurde das Adrenalon im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,0844 g Substanz gaben 0,1835 g CO_2, entsprechend 59,31 Proz. C, und 0,0481 g H_2O, entsprechend 6,38 Proz. H.

0,0969 g Substanz gaben 6,55 ccm N (21°, 760 mm), entsprechend 7,75 Proz. N.

Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$:		Gefunden:
C	59,63 Proz.	59,31 Proz.
H	6,12 „	6,38 „
N	7,75 „	7,75 „

In dem Patentbericht der Höchster Farbwerke ist darauf aufmerksam gemacht worden, daß das Methylaminoacetobrenzkatechin blutdrucksteigernde Wirkung besitzt, später haben Loewi und und Meyer[1]) gezeigt, daß diesem Körper qualitativ dieselbe Wirkung zukommt wie dem Adrenalin. Quantitativ besteht jedoch zwischen dem Adrenalon und dem Adrenalin ein erheblicher Unterschied. Das Adrenalon wirkt etwa 1000 mal schwächer als das Adrenalin.

0,0005 g Chlorhydrat, einem Kaninchen von 2,4 kg injiziert, steigerten den Blutdruck um 8 mm, 0,0054 g um 68 mm und 0,027 g um 94 mm.

2. Tribenzolsulfoadrenalon.

Bei der Darstellung des synthetischen Tribenzolsulfoadrenalons bin ich denselben Schwierigkeiten begegnet wie bei der Darstellung des entsprechenden Abbauproduktes. Auch hier gelang es zwar mühelos, den gesuchten Körper in körnig kristallinischem Zustande zu gewinnen, dagegen war es nicht leicht, das Produkt in gut ausgebildeten Kristallen zu erhalten.

1,8 g Adrenalon werden mit 5 ccm Benzolsulfochlorid übergossen und das Gefäß nach Zusatz von 40 ccm 10 prozentiger Natronlauge kräftig geschüttelt. Es tritt sehr rasch Reaktion unter Erwärmung ein, die durch

[1]) l. c.

Kühlung gegen fließendes Wasser, ev. durch hineingeworfene Eisstückchen gemäßigt wird. Nachdem eine halbe Stunde geschüttelt worden ist, wobei das verbrauchte Benzolsulfochlorid von Zeit zu Zeit ersetzt wird, wird das während der Reaktion ausgeschiedene Benzolsulfoderivat abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Es wird in Eisessig gelöst und mit Wasser und Natriumacetat gefällt. Nach mehrstündigem Stehen im Eisschrank ist das Produkt körnig und doppelbrechend; es wird abgesaugt und durch wiederholtes Lösen in Eisessig und Fällen mit Wasser gereinigt. 1,8 g Base lieferten 3,7 g analysenreines Tribenzolsulfoadrenalon.

Natürlich gelingt die Darstellung des Tribenzolsulfoadrenalons ebensogut, wenn man anstatt vom freien Adrenalon von seinem Chlorhydrat ausgeht. 4,3 g Chlorhydrat, mit 11 ccm Benzolsulfochlorid und 70 ccm 10 prozentiger Natronlauge geschüttelt, gaben 9,5 g Tribenzolsulfoadrenalon.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1469 g Substanz gaben 0,2907 g CO_2, entsprechend 53,98 Proz. C, und 0,0508 g H_2O, entsprechend 3,87 Proz. H.

0,1653 g Substanz gaben 4,09 ccm N (21°, 761 mm), entsprechend 2,83 Proz. N.

Berechnet für $C_{27}H_{23}NS_3O_9$:		Gefunden:
C	53,87 Proz.	53,98 Proz.
H	3,85 „	3,87 „
N	2,34 „	2,83 „

Das Produkt hat keinen scharfen Schmelzpunkt, es zeigt die gleichen Löslichkeitsverhältnisse wie das entsprechende Abbauprodukt, wie es überhaupt in keiner Weise von diesem zu unterscheiden ist.

Auch bezüglich des p-Nitrophenylhydrazons besteht bei beiden Körpern Übereinstimmung. Es wurde durch Zusammenschmelzen von Tribenzolsulfoadrenalon und p-Nitrophenylhydrazin unter Zusatz eines Tropfens Eisessig gewonnen und in der auf S. 107 geschilderten Weise zur Analyse vorbereitet.

Die Stickstoffbestimmung ergab hier ebenfalls einen zu niedrigen Wert.

0,1504 g Substanz gaben 7,99 ccm (N 19,8°, 760 mm), entsprechend 6,13 Proz. N.

Berechnet für $C_{33}H_{26}N_4S_3O_{10}$:		Gefunden:
N	7,64 Proz.	6,13 Proz.

Die Darstellung von kristallisiertem Tribenzolsulfoadrenalon geschah analog derjenigen des Abbauproduktes.

2,5 g Adrenalonchlorhydrat werden mittels Benzolsulfochlorid acyliert und das weiße Tribenzolsulfoderivat durch wiederholtes Lösen in Eisessig und Fällen mit Wasser gereinigt. Das erhaltene Produkt wird in wenig Eisessig gelöst und die Lösung in einem verschlossenen Gefäß vier Tage

stehen gelassen. Dabei kristallisieren 1,8 g Tribenzolsulfoadrenalon aus. Produkt wird abgesaugt und mit Alkohol ausgewaschen. Es ist noch nicht rein und hat den Schmelzpunkt 98°. Zur weiteren Reinigung wird es in 50 ccm Alkohol gelöst und die Lösung von wenig Ungelöstem abgegossen. Beim Erkalten bildet sich eine ölige, von wenigen Kristallen durchsetzte Ausscheidung, von der die darüber stehende klare Flüssigkeit getrennt wird. Letztere liefert beim Stehen 0,8 g eines prächtigen kristallinischen Produktes vom Schmelzpunkt 106 bis 107°. Die ölige Ausscheidung wird zuerst aus Methylalkohol umkristallisiert und die erhaltene Kristallmasse noch einmal aus Äthylalkohol. Es wurden 0,4 g Substanz vom Schmelzpunkt 106 bis 108° erhalten.

Zur Analyse wurde das Tribenzolsulfoadrenalon im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Die Analyse wurde nach Dennstedt ausgeführt.

0,2628 g Substanz gaben 0,5205 g CO_2, entsprechend 54,02 Proz. C, und 0,1006 g H_2O, entsprechend 4,28 Proz. H.

0,2628 g Substanz = 200 ccm, 192 ccm = 0,2522 g Substanz gaben 0,2972 g $BaSO_4$, entsprechend 16,18 Proz. S.

0,2804 g Substanz gaben 7,4 ccm N (18°, 751 mm), entsprechend 3,01 Proz. N.

Berechnet für $C_{27}H_{23}NS_3O_9$:		Gefunden:
C	53,97 Proz.	54,02 Proz.
H	3,85 „	4,28 „
N	2,34 „	3,01 „
S	15,99 „	16,18 „

Die Löslichkeitsverhältnisse des synthetischen Tribenzolsulfoadrenalons sind die gleichen wie die des entsprechenden Abbauproduktes. Es ist spielend löslich in Aceton, Chloroform und Pyridin, leicht löslich in heißem Benzol und in heißem Essigäther, in den beiden letzteren Lösungsmitteln schwer löslich in der Kälte; es ist mäßig löslich in heißem Alkohol, leicht löslich in heißem Eisessig und unlöslich in Äther, Petroläther und Wasser.

Bezüglich der Kristallform des synthetischen Tribenzolsulfoadrenalons habe ich eine Besonderheit gefunden, die mir bei dem durch Abbau erhaltenen Produkt nicht begegnet ist. Das synthetische Tribenzolsulfoadrenalon kristallisiert nämlich in zwei deutlich voneinander unterscheidbaren Formen. In der einen Form erscheint es in dreiseitigen Plättchen, die zu Drusen vereint sind. Der Winkel an der Basis der Plättchen wurde bei einmaliger Messung zu 76° gefunden. Die Plättchen zeigen keine Querlinien, die auf Spaltbarkeit deuten. Im polarisierten Licht untersucht, löschen sie das Licht aus bei Einstellung der auf ihrer Basis errichteten Senkrechten parallel zu einem der Schenkel des Fadenkreuzes.

Als zweite Form wurden lange rhombische Spieße beobachtet, die zu großen Drusen vereint waren. Die einzelnen Kristalle zeigen feine Spaltbarkeitslinien. Im Polarisationsmikroskop untersucht, zeigen sie Lichtauslöschung bei Einstellung ihrer Längsachse parallel zu einem der Schenkel des Fadenkreuzes.

Daß es sich bei den beiden Kristallformen des synthetischen Tribenzolsulfoadrenalons nicht um verschiedene chemische Substanzen handelt, geht daraus hervor, daß beide Kristallformen denselben Schmelzpunkt 106 bis 107° haben und daß der Schmelzpunkt sich beim Mischen der beiden Kristallformen nicht ändert. Herr Prof. Bücking, der in dankenswerter Freundlichkeit die kristallographische Prüfung dieser Substanzen ausführte, hält es nicht für ausgeschlossen, daß die eine Form sich aus der anderen ableiten läßt.

Bei einem kristallographischen Vergleich des synthetischen Tribenzolsulfoadrenalins, das in rhombischen Spießen kristallisiert war, mit dem Tribenzolsulfoadrenalon, das durch Abbau gewonnen war, sprach sich Herr Prof. Bücking für unbedingte Identität der beiden Präparate aus.

Die Identität des Abbauproduktes und des synthetischen Produktes wird ferner dadurch bewiesen, daß beide Präparate ebenso wie ein Gemisch von gleichen Teilen des durch Synthese und Abbau gewonnenen Präparates, am selben Thermometer erhitzt, gleichzeitig und scharf bei 106 bis 107° schmelzen.

Als fernerer Identitätsbeweis mag angeführt werden, daß das synthetische Tribenzolsulfoadrenalon dasselbe p-Nitrophenylhydrazon bei gleicher Darstellung (S. 111) liefert wie das Abbauprodukt, und daß es bei der Oxydation eine Substanz vom Schmelpunkt 196 bis 197° liefert, die identisch ist mit dem auf S. 111 ff. beschriebenen Körper.

Die Identität des synthetischen Tribenzolsulfomethylaminoacetobrenzkatechins mit dem Tribenzolsulfoadrenalon beweist, daß die durch Abbauversuche gewonnene Vorstellung über die Konstitution des Tribenzolsulfoadrenalins richtig ist. Dementsprechend ist die Konstitution des Adrenalins die folgende:

$$\begin{array}{l}\text{OH}\langle\;\;\rangle\text{—CH(OH).CH}_2\text{.NH.CH}_3\\ \text{OH}\end{array}$$

Die Klarstellung der Konstitution des Adrenalins rückt die Frage nach der Bildung des Adrenalins im Tierkörper in den

Vordergrund des physiologischen Interesses. Da das Adrenalin zweifellos aus stickstoffhaltigen Substanzen stammt, so wird man wohl nicht fehlgehen, wenn man die Muttersubstanz dieses interessanten Körpers im Eiweiß sucht. Nun sind aber keine Eiweißkörper bekannt, die Brenzkatechinreaktionen geben, so daß dieses Dioxybenzolderivat erst durch oxydativen Abbau einer seiner den Benzolkern enthaltenden Bausteine entstanden sein dürfte. Wenn es erlaubt ist, über diese synthetische Muttersubstanz eine Vorstellung zu äußern, so möchte ich der Vermutung Ausdruck geben, daß möglicherweise in einigen Eiweißkörpern ein Oxyphenylserin [1]) oder ein Oxyphenylmethylserin vorgebildet ist:

I.

—$CH(OH).CH(NH_2).COOH$

OH

II.

—$CH(OH).CH(NH.CH_3).COOH$

OH

Beide Körper könnten durch Oxydation (Oxyphenylserin bei nachträglicher Methylierung) leicht in eine dem Adrenalin nahestehende Substanz übergehen, die ich Adrenalinsäure nennen möchte.

III.

OH —$CH(OH).CH(NH.CH_3).COOH$.

OH

Letztere könnte durch fermentative Kohlensäureabspaltung nach Art der von Emerson [2]) am Tyrosin beobachteten Adrenalin

IV.

OH —$CH(OH).CH_2(NH.CH_3)$

OH

liefern.

Ich bin damit beschäftigt, nach diesen Substanzen in Nebennierenextrakten zu suchen.

---

[1]) Langstein (Diese Beiträge 1, 510) erhielt bei langdauernder Pepsinverdauung von Bluteiweiß eine Substanz, die die Millonsche Reaktion gab und nicht Tyrosin war. Ihr Stickstoffgehalt war 6,98 Proz.; für Oxyphenylserin würde sich 7,10 Proz. berechnen.

[2]) Diese Beiträge 1, 502.

Auch nach anderer Richtung ergibt die Klarstellung der Konstitution des Adrenalins eine bedeutsame Fragestellung. Unsere Kenntnisse über den oxydativen Abbau der aromatischen Abkömmlinge der Eiweißkörper gründen sich im wesentlichen auf Resultate, die bei dem Studium der als Alkaptonurie bezeichneten Stoffwechselanomalie gewonnen worden sind. Diese Versuche [1]) haben ergeben, daß der Abbau dieser Benzolderivate im intermediären Stoffwechsel im wesentlichen über die Homogentisinsäure

OH

$—CH_2.COOH$

OH

also über para-Dioxybenzolderivate führt. Das Auftreten eines ortho-Dioxybenzolderivates, wie des Adrenalins, im intermediären Stoffwechsel weist darauf hin, daß dieser Oxydationsmechanismus nicht der einzige ist, über den der Organismus verfügt, und man wird mit der Vermutung kaum fehlgehen, daß der oxydative Abbau zu ortho-Dioxybenzolderivaten gerade eine Besonderheit der als „chromaffine Gewebe" [2]) beschriebenen Gewebsgruppen bedeutet.

Wenn somit die Klarstellung der Konstitution des Adrenalins eine Reihe neuer Fragen nach physiologischer Seite anregt, so darf andererseits der Hoffnung Ausdruck gegeben werden, daß sie sich auch für die technische Gewinnung des für die praktische Medizin so wichtigen Adrenalins fruchtbar erweisen wird.

---

[1]) Baumann und Wolkow, Zeitschr. f. physiol. Chem. **15**; Falta und Langstein, ebend. **37**.

[2]) Alfred Kohn, Das chromaffine Gewebe. Ergebnisse der Anatomie und Entwickelungsgeschichte **12**, 253 (1903).

Straßburg i. E., den 10. Januar 1906.

VIII.

Über Acetonbildung in der Leber.

Von Dr. **G. Embden,**
Vorstand des chemischen Laboratoriums am städtischen Krankenhause,
und Dr. **F. Kalberlah,** Assistenzarzt.

Aus dem städtischen Krankenhause Frankfurt a. M. Innere Abteilung.
(Oberarzt: Prof. Dr. C. von Noorden.)

Erste Mitteilung.

Vor kurzem haben Almagia und der eine[1]) von uns die Beobachtung gemacht, daß bei der künstlichen Durchströmung der lebensfrischen Leber mit normalem Blut eine flüchtige, jodoformbildende Substanz entsteht, deren Natur zunächst nicht völlig aufgeklärt wurde, wenn auch verschiedene Umstände dafür sprachen, daß es sich in unseren Versuchen um eine Bildung von Aceton im „überlebenden" Organ handelte.

Die nächste Aufgabe, die bei einer weiteren Verfolgung des genannten Befundes zu lösen war, bestand sonach darin, die jodoformbildende Substanz endgültig zu identifizieren, und diese Identifikation bildet den ersten Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Es gelang, wie gleich hier hervorgehoben sei, festzustellen, daß der flüchtige, jodoformbildende Körper in der Tat, unserer früher ausgesprochenen Vermutung entsprechend, Aceton war.

Des weiteren war nun zu entscheiden, ob lediglich die Leber Aceton bildet, oder ob diese Substanz auch bei der Durchströmung anderer Organe entsteht.

Außer an der Leber wurden daher auch am Muskel, an der Niere und an der Lunge Durchblutungsversuche angestellt, wobei

---

[1]) Almagia, M. und Embden, G., Über das Auftreten einer flüchtigen, jodoformbildenden Substanz bei der Durchblutung der Leber. Diese Beiträge 6, 59, 1904.

sich ergab, daß im Gegensatz zur Leber keines dieser Organe unter den gegebenen Versuchsbedingungen Aceton zu bilden vermag.

Schließlich suchten wir zu ermitteln, in welchem Umfange die Acetonbildung in der Leber bei Durchströmung mit normalem Blute erfolgt. Eine derartige Feststellung bildete die notwendige Voraussetzung für eine Reihe weiterer Untersuchungen, die in der nächstfolgenden Arbeit niedergelegt sind.

I. Zum Nachweis des bei der Durchströmung der Leber mit normalem Blute auftretenden Acetons diente uns ein Kondensationsprodukt des letzteren mit Benzaldehyd, das Dibenzalaceton, $C_6H_5CH=CH-CO-CH=CHC_6H_5$, das bereits von Vorländer und Hobohm[1]) zur Erkennung geringer Acetonmengen benutzt wurde.

Im einzelnen gestaltete sich der Nachweis der jodoformbildenden Substanz und ihre Identifikation als Aceton folgendermaßen:

Die Leber eines kleinen oder mittelgroßen Hundes (meist etwa 6 bis 9 kg Körpergewicht) wurde während 75 bis 90 Minuten mit 1500 bis 1600 ccm Rinderblut oder einer wechselnden Menge Hundeblut durchströmt[2]).

An gleichen, gemessenen Teilen des Blutes vor und nach der Durchblutung wurden Bestimmungen der Menge flüchtiger, jodbindender Substanz nach Messinger-Huppert ausgeführt. Hierbei wurden in einigen Fällen je 100 ccm Blut mit etwa der 4- bis 5fachen Menge 1- bis 2proz. Lösung vom primären Kaliumphosphat versetzt und unter möglichst guter Kühlung einige 100 ccm Flüssigkeit abdestilliert; das gewonnene Destillat wurde mit Schwefelsäure angesäuert und der nochmaligen Destillation unterworfen. Die Bestimmung nach Messinger-Huppert geschah dann in diesem zweiten Destillat.

In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurde das Blut nach der von Schenck[3]) für die Blutzuckerbestimmung angegebenen Methode mit Salzsäure und Sublimat gefällt, und das aus je 400 bis 500 ccm Filtrat gewonnene Destillat direkt zur Titration verwendet[4]).

---

[1]) Ber. d. D. chem. Ges. 29, 1840.

[2]) Die Hunde wurden in leichter Äthernarkose aus beiden Femoralarterien entblutet. Zur Kontrolle wurde die Entblutung mehrmals ohne Narkose vorgenommen, was auf das Versuchsresultat keinen merklichen Einfluß ausübte.

Bezüglich aller weiteren Einzelheiten bei der Durchblutung sei auf die Arbeiten von Embden und Glässner (diese Beiträge 1, 310, und Embden und v. Fürth hingewiesen [diese Beiträge 4, 421 (1903)].

[3]) Fr. Schenck, Über Bestimmung und Umsetzung des Blutzuckers, Pflügers Archiv 55, 203.

[4]) Almagia und Embden hatten gezeigt, daß durch die verschiedenartige Verarbeitung des Blutes ein wesentlicher Unterschied in den Resultaten nicht bedingt ist.

In allen Fällen zeigte sich, daß eine ganz erhebliche Menge jodoformbildender Substanz bei der Durchblutung aufgetreten war, worauf unten noch im einzelnen einzugehen sein wird.

Bei der Gewinnung des Dibenzalacetons gingen wir ebenfalls entweder von Destillaten, die direkt aus dem mit Monokaliumphosphatlösung verdünnten Blute oder von solchen, die aus dem Filtrate der Schenckschen Fällung gewonnen waren, aus. In unseren späteren Versuchen benutzten wir stets je 500 ccm Blut, oder — bei Verwendung der Schenckschen Methode — die 500 ccm Blut entsprechende Filtratmenge (3000 ccm). Durch wiederholte fraktionierte Destillation wurde die flüchtige, jodoformbildende Substanz möglichst konzentriert. Das zuletzt gewonnene Destillat wurde in Reagenzgläser aufgefangen (in jedes Reagenzglas kamen 20 ccm Destillat).

Der Inhalt jedes Reagenzglases wurde mit 2 ccm 10proz. Natronlauge und 2 Tropfen Benzaldehyd versetzt, die Flüssigkeit zur Lösung des Benzaldehyds geschüttelt und gut verschlossen bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen.

Behandelt man 500 ccm Rinderblut, wie es vom Schlachthofe bezogen wird, oder nach mehrstündigem Stehen in der eben geschilderten Weise, so tritt in dem ersten, vielleicht noch in dem zweiten Reagenzglase erst nach Verlauf einer Reihe von Stunden eine ganz schwache Trübung auf, die sich entweder gar nicht oder erst nach mehreren Tagen absetzt und nun einen ganz geringfügigen, unwägbaren Niederschlag bildet.

Das gleiche Verfahren führt bei Blut, das zur künstlichen Durchströmung der Leber verwendet wurde, rasch zu einer starken anfänglich öligen Trübung, die — meist im Verlaufe von 24 Stunden — sich in einen reichlichen, schön kristallinischen Niederschlag umwandelt. Bei der von uns angewandten Destillationsart ging bei weitem die Hauptmasse der mit dem Benzaldehyd reagierenden Substanz in die ersten 20 ccm Destillat über; die Menge des Niederschlages im zweiten Reagenzglas war meist schon recht gering, im dritten Reagenzglas entstand gewöhnlich nur eine Trübung, während die Flüssigkeit in den folgenden Eprouvetten völlig klar blieb.

Die Reinigung des gewonnenen Produktes bereitete anfänglich einige Schwierigkeiten, gelang dann aber sehr leicht, als wir in folgender Weise vorgingen: Der Niederschlag wurde auf einem kleinen gehärteten Filter gesammelt, unter Anwendung der Saugpumpe bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion des Waschwassers gewaschen, wobei die ersten Teile des Waschwassers trübe durchgingen [1]). Nunmehr wurde der Niederschlag

[1]) Nach mehrtägigem Stehen verwandelte sich die Trübung des Waschwassers meist in einen kristallinischen Niederschlag, dessen Menge aber stets unbeträchtlich war.

in wenigen Cubikcentimetern heißen Alkohols gelöst und auf dem Wasserbade mit heißem Wasser bis zur eben beginnenden Trübung versetzt. Die gut bedeckte Flüssigkeit wurde der langsamen Abkühlung überlassen, wobei sich die Hauptmasse des Produktes wiederum kristallinisch abschied. Der geringe, ölig gebliebene Anteil konnte leicht durch Filtration und Auswaschen mit kaltem Wasser entfernt werden.

Das so gewonnene Produkt zeigte makroskopisch und mikroskopisch das charakteristische Aussehen des Dibenzalacetons und meist schon nach diesem ersten, zum mindesten aber nach nochmaligem Umkristallisieren den richtigen Schmelzpunkt (111 bis $111^1/_2{}^0$ unkorr.; Smp. korr. 112^0[1]).

Hiermit war der Nachweis erbracht, daß die bei der Durchblutung der Leber mit normalem Blute auftretende flüchtige[2]) jodoformbildende Substanz Aceton ist.

II. Die Frage, ob außer der Leber noch andere Organe bei der Durchblutung mit normalem Blute Aceton bilden, wollen wir nur in aller Kürze behandeln.

Wir haben zweimal die Muskulatur (beide Hinterschenkel des Hundes), einmal die Lunge und einmal die Niere durchblutet.

Bezüglich der Technik können wir auch hier im allgemeinen ganz auf die Angaben von Embden und Glaessner[3]) verweisen.

Bei der Durchströmung der Muskulatur und der Niere konnten wir nicht, wie in der Mehrzahl unserer Leberversuche, Rinderblut benutzen, weil bei Anwendung desselben sich in den genannten Organen sehr bald ein auch für hohen Druck unüberwindliches Stromhindernis ausbildete, während bei Verwendung von Hundeblut die Durchblutung ohne Störung verlief. In keinem der eben genannten Versuche traten nachweisbare Mengen flüchtiger, jodoformbildender Substanz auf, was nicht etwa auf die Verwendung von Hundeblut statt Rinderblut zurückzuführen war. Denn in zwei Leberversuchen mit Hundeblut ließ sich feststellen, daß das arteigene, ebenso wie das artfremde Blut Aceton bildet.

---

[1]) Die Ausbeute an dem gründlich mit kaltem Wasser gewaschenen und bei gelinder Wärme zur Gewichtskonstanz getrockneten Rohprodukt wurde in zwei Fällen unter Zugrundelegung der titrimetrisch ermittelten Menge bei der Durchblutung gebildeten Acetons bestimmt. Sie betrug einmal erheblich weniger, einmal erheblich mehr als die Hälfte der theoretisch berechneten Menge.

Das Produkt wog in beiden Fällen annähernd 0,02 g, was in Rücksicht auf einige Angaben der folgenden Arbeit hier erwähnt sei.

[2]) Die nicht durchblutete, frische Leber liefert, wie bekannt, und wie außerdem Almagia und Embden besonders feststellten, nur Spuren flüchtiger, jodbindender Substanz.

[3]) Embden, G. und Glaessner, K., a. a. O.

Die Technik der Muskel- und Nierenversuche unterschied sich von der bei der Leber angewandten auch dadurch, daß wir die Durchblutung mit geringeren Blutmengen durchführen und nach kürzerer Zeit abbrechen mußten[1]).

Die in Betracht kommenden Einzelheiten dieser Versuche gehen aus der Tabelle I hervor.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuches	Durchblutetes Organ	Menge des verwandten Blutes und Blutart	Dauer der Durchblutung Min.	Durch das Destillat aus 100 ccm Blut A gebundene Menge $\frac{n}{10}$-Jodlösung ccm	Durch das Destillat aus 100 ccm Blut B gebundene Menge $\frac{n}{10}$-Jodlösung ccm	Bemerkungen
1	Muskulatur	710 ccm Hundeblut	40	—	2,0	Blut von 2 Hunden
2	Muskulatur	1100 ccm Hundeblut	45	2,0	1,3	
3	Lunge	1500 ccm Rinderblut	75	1,9	1,7	
4	Niere	1300 ccm Hundeblut	60	2,5	2,5	

Zur Erklärung der Tabelle sei nur bemerkt, daß Kolonne 5 und 6 die Menge Jodlösung angeben, die von dem Destillat aus 100 ccm Blut vor der Durchblutung (Blut A) und nach der Durchblutung (Blut B) gebunden wurde. In keinem Falle ließ sich, im Gegensatz zu sämtlichen Versuchen an der Leber, in dem Destillat aus Blut B ein Jodoformniederschlag erzielen[2]) und

[1]) Auftretende Blutungen ließen einen früheren Abschluß des Versuches erwünscht oder notwendig erscheinen.

[2]) Sowohl in diesen, wie in den weiter unten mitzuteilenden Versuchen 12 und 13 enthielt das Hundeblut weit mehr flüchtige jodbindende Substanz als das Rinderblut. Um Aceton handelte es sich — jedenfalls der Hauptmasse nach — nicht, denn dann hätte unter den gegebenen Bedingungen nach unseren Erfahrungen Jodoformbildung eintreten müssen. Ob übrigens die jodbindende Substanz in der beobachteten Menge als ein Bestandteil des normalen Hundeblutes zu betrachten ist, oder ob ihr relativ reichliches Auftreten nur durch die bei der Entblutung notwendige Äthernarkose bedingt war, muß dahingestellt bleiben.

nirgends wurde von dem Destillat aus Blut B, ebenfalls im Gegensatz zu sämtlichen Leberversuchen, mehr Jodlösung gebunden als von dem Destillat aus Blut A[1]).

Es kommt sonach, wie nochmals hervorgehoben sei, von den untersuchten Organen nur der Leber die Fähigkeit zu, bei der künstlichen Durchströmung mit normalem Blute Aceton zu bilden.

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7
Nr. des Versuches	Angewandte Blutart	Dauer der Durchblutung	Durch das Destillat aus 100 ccm Blut A gebundene Menge $\frac{n}{10}$-Jodlösung	Durch das Destillat aus 100 ccm Blut B gebundene Menge $\frac{n}{10}$-Jodlösung	Gebildete Menge Aceton pro Liter	Bemerkungen
		Min.	ccm	ccm	mg	
5	Rinderblut	130	0,7	2,2	14	
6	„	90	0,4	2,0	15	
7	„	90	0,4	1,6	12	
8	„	90	0,3	3,0	26	
9	„	90	0,7	2,5	17	
10	„	75	0,4	3,2	27	
11	„	75	0,5	1,8	13	
12	„	120	0,3	2,6	22	Die Leber des Hundes war durch vorangegangene Rohrzuckerfütterung besonders glykogenreich
13	„	75	0,4	1,7	13	
14	850 ccm Hundeblut	90	2,6	4,0	[14]	Siehe Text
15	750 ccm Hundeblut	75	1,8	4,3	[24]	Siehe Text

[1]) In Versuch 1 können wir allerdings leider keinen zuverlässigen Wert für die von dem Blutdestillate vor der Durchblutung gebundene Jodmenge angeben, da die betreffende Bestimmung nicht in einwandfreier Weise ausgeführt wurde und uns Material zur Wiederholung nicht zur Verfügung stand.

III. Über den Umfang dieser Acetonbildung in der Leber gibt die Tabelle II, deren Anordnung ganz ähnlich wie die der Tabelle I ist, Aufschluß.

Kolonne 4 und 5 geben die Cubikcentimeter $\frac{n}{10}$-Jodlösung an, die durch das Destillat aus je 100 ccm Blut A und B gebunden wurde. Diese Werte sind nur zum kleinsten Teil direkt ermittelte Titrationswerte; die Titration erfolgte vielmehr fast ausnahmslos an dem Destillat aus 400 oder 500 ccm des nach der Schenckschen Fällung erhaltenen Filtrats (entsprechend etwa 66,6 bzw. 83,3 ccm Blut) und nur der besseren Übersicht halber sind alle Werte auf 100 ccm Blut berechnet. Öfters angestellte Doppelbestimmungen ergaben stets befriedigende Übereinstimmung [1]).

Ein äußerst geringfügiger Fehler ist in einigen anfänglichen Versuchen dadurch bedingt, daß, wie sich herausstellte, die verwendete Kalilauge für sich ganz geringe Mengen Jodlösung band. Da die Menge der gebundenen Jodlösung nur von der Menge der zugefügten Kalilauge abhing, und wir die Destillate aus Blut A und B mit gleichen Mengen Kalilauge versetzt hatten, betrifft dieser Fehler überdies nur die absoluten Werte, während die Differenz zwischen den letzteren richtig ermittelt wurde.

Das Destillat aus Blut A gab mit Kalilauge und Jodlösung in keinem Falle Jodoformniederschlag; das von B, wie bereits erwähnt, ausnahmslos.

In allen Fällen, wo die Durchblutung mit Rinderblut erfolgte, kamen 1500 bis 1600 ccm Blut zur Verwendung; in den beiden Fällen, wo wir Hundeblut benutzten, ist die Menge aus der Tabelle (Kolonne 2) ersichtlich. Kolonne 6 gibt darüber Auskunft, wieviel Milligramm Aceton pro Liter Blut gebildet wurden [2]).

Dieser Wert schwankt bei den neun angestellten Versuchen zwischen 12 mg in Versuch 7 und 27 mg in Versuch 10. Ein Einfluß der Durchblutungszeit, die übrigens mit Ausnahme von Versuch 5 und 12 in allen Fällen eine sehr ähnliche war, läßt sich nicht erkennen. Dagegen sei etwas, was aus der Tabelle nicht zu ersehen ist, besonders hervorgehoben, die Abhängigkeit der Acetonbildung von der Vollkommenheit der Durchblutung; je geringer der nötige Druck, je größer die Strömungsgeschwindigkeit, je vollkommener die Arterialisierung des Blutes, um so mehr Aceton wird gebildet; das ist eine Erfahrung, die wir in noch ausgedehnterem Maße als in dieser in der folgenden Arbeit gemacht haben.

---

[1]) Die höchste beobachtete Titrationsdifferenz betrug 0,2 ccm.

[2]) In den beiden Versuchen mit Hundeblut wurde weniger als 1 Liter Blut verwandt. Die auch hier für das Liter berechneten Werte sind deswegen eingeklammert.

In mehreren Versuchen haben wir den zur Arterialisierung verwandten Luftstrom, nachdem er das Blut durchstrichen hatte, durch Vorlagen mit einigen 100 ccm eisgekühlten Wassers geleitet. Das Vorlagenwasser wurde destilliert und in dem Destillat das Aceton bestimmt.

Es ergab sich, daß das durch den Luftstrom mitgeführte Aceton bereits in der ersten Vorlage nahezu quantitativ zurückgehalten wurde und daß — wenigstens bei den Durchblutungsversuchen mit normalem Blute — auch die aus der ersten Vorlage gewinnbare Acetonmenge so geringfügig war, daß sie vernachlässigt werden konnte.

Sie betrug in einem Versuch unbedeutend mehr, in einem weiteren etwas weniger als 1 mg, was in beiden Fällen bei der für die Durchströmung verwandten Blutmenge von 1500 bis 1600 ccm für die auf das Liter Blut bezogenen Angaben in Tabelle II einen weit geringeren Fehler als 1 mg Aceton ausmacht.

Wenn in unseren Versuchen die Leber als einziges Organ Aceton bildete, so folgt daraus allerdings keineswegs, daß die eben genannte Substanz immer und unter allen Umständen nur in der Leber entsteht. Denn ganz abgesehen davon, daß Durchblutungsversuche niemals ein völlig getreues Abbild der Vorgänge im lebenden Organismus zu geben vermögen, gibt es augenscheinlich im Tierkörper sehr verschiedenartige Quellen des Acetons[1]) und sind es allem Anschein nach sehr verschiedene biochemische Prozesse, die zur Acetonbildung führen.

Immerhin ist in der Tatsache, daß bei Durchströmung mit normalem Blute nur die Leber Aceton entstehen läßt, ein Hinweis darauf zu erblicken, daß diesem Organ für die Acetonbildung im Tierkörper eine hervorragende Bedeutung zukommt.

Für die Auffassung der Lehre von der Acetonbildung in pathologischen Zuständen, namentlich beim Diabetes mellitus, erscheint dies insofern von nicht unerheblichem Interesse, als sich für die Störungen im Kohlehydratumsatz und für das abnorme Auftreten von Aceton wenigstens gemeinschaftliche lokale Beziehungen zu ergeben scheinen.

---

[1]) Siehe hierüber die nachstehende Arbeit.

IX.

Über Acetonbildung in der Leber.

Von Dr. **G. Embden**,
Vorstand des chemischen Laboratoriums am städtischen Krankenhause,
Dr. **H. Salomon**, Sekundärarzt und Dr. **Fr. Schmidt**, Assistenzarzt.

Aus dem städtischen Krankenhause zu Frankfurt a. M. (Oberarzt: Prof. Dr. C. von Noorden).

Zweite Mitteilung: Quellen des Acetons.

1.

In der voranstehenden Arbeit wurde gezeigt, daß bei der künstlichen Durchströmung der Leber mit Blut Aceton gebildet wird.

Wohl war dieser Befund nicht ohne Bedeutung, aber an und für sich bot er zunächst doch gleichsam nur topographisches Interesse.

Eine wirkliche Vertiefung unserer Kenntnisse von der Acetonbildung im Tierkörper konnte nur von der Aufklärung des unter den gegebenen Versuchsbedingungen sich abspielenden Chemismus erwartet werden.

Die Frage, aus welchen Substanzen die künstlich durchblutete Leber Aceton bildet, und wie diese Acetonbildung im einzelnen sich vollzieht, schien uns von verschiedenen Gesichtspunkten aus einer eingehenderen Bearbeitung in hohem Maße wert zu sein.

Ist doch das Aceton als ein normales, intermediäres Stoffwechselprodukt anzusehen, wie schon daraus hervorgeht, daß es, wenn auch in äußerst geringer Menge, im normalen Blute nachweisbar ist, und kommt doch dem vermehrten Auftreten dieser Substanz in krankhaften Zuständen, insbesondere beim Diabetes mellitus, eine ganz hervorragende praktische Bedeutung zu.

Namentlich aber konnte die Erkenntnis, daß aus bestimmten, ihrer Struktur nach genau bekannten Substanzen Aceton entsteht,

nicht ohne Einfluß bleiben auf unsere Anschauungen über die Umwandlungen dieser Substanzen im Tierkörper überhaupt.

In der Tat schienen uns hier die Bedingungen für ein derartiges Studium von Vorgängen des intermediären Stoffwechsels äußerst günstig zu liegen:

Wo das Aceton als Abbauprodukt einer bestimmten Substanz auftrat, da mußte unter Umständen seine charakteristische Struktur ohne weiteres diejenige Atomgruppe der Muttersubstanz bezeichnen, der es entstammte.

Das Auftreten zwar nicht völlig bestimmter, aber doch einigermaßen begrenzter Acetonmengen bei der Durchströmung der Leber mit normalem Blute [1]) ließ erhoffen, daß eine vermehrte Acetonbildung unter der Einwirkung von Zusätzen zum Blute genügend deutlich hervortreten würde, namentlich da das einmal gebildete Aceton allem Anschein nach in der isolierten Leber sehr schwer verbrennlich oder unverbrennlich ist.

Die Möglichkeit, das gebildete Aceton in äußerst exakter und dabei recht einfacher Weise seiner Menge nach zu bestimmen, mußte bei den zahlreichen notwendigen Versuchen uns die Arbeit wesentlich erleichtern.

Auf die Frage, aus welchen Substanzen das bei der Durchströmung der Leber mit normalem Blute auftretende Aceton gebildet wird, werden wir in der vorliegenden Untersuchung nicht einzugehen haben; wir stellen uns hier vielmehr nur die Aufgabe, festzustellen, welche Substanzen bei ihrem Zusatz zum Durchblutungsblut eine vermehrte Acetonbildung bewirken, und den Chemismus dieser vermehrten Acetonbildung möglichst aufzuklären.

2.

In der vorliegenden Versuchsreihe mußten wir selbstverständlich bestrebt sein, bis auf die Verschiedenartigkeit der Zusätze zum Blute alle Bedingungen bei den einzelnen Versuchen möglichst gleichartig zu gestalten.

Wir haben daher bei unseren Versuchen nur Hunde von ähnlichem Körpergewicht (etwa 6 bis 9 kg) verwendet. Die letzte Fütterung erfolgte mit wenigen Ausnahmen 24 Stunden vor der Tötung [2]).

[1]) Siehe Embden und Kalberlah, die voranstehende Arbeit.

[2]) Überdies hatten wir uns in der voranstehenden Arbeit überzeugt, daß der Ernährungszustand an sich keinen wesentlichen Einfluß auf den Umfang der Acetonbildung ausübt.

Die Tötung geschah, wie in der voranstehenden Arbeit, in leichter Äthernarkose durch Verblutung aus beiden Femoralarterien.

Die Vorbereitung der Leber für die Durchblutung erfolgte in allen Fällen mit möglichster Beschleunigung. Etwa 8 bis 10 Minuten nach dem Tode des Tieres war die Durchblutung stets im Gange. Der Zusatz der zu untersuchenden Substanzen begann erst dann, wenn die Temperatur des Durchblutungsblutes 40° erreicht hatte, was meist etwa 5 bis 7 Minuten nach Beginn der Durchblutung der Fall war, und war etwa 20 Minuten später beendet. Die Durchblutung der Leber geschah, wo nicht ausdrücklich etwas anderes bemerkt ist, mit 1600 ccm Rinderblut; die Dauer des Versuches betrug 75 Minuten, nur im Anfange unserer Versuche kamen einige ganz geringfügige Abweichungen von dieser Versuchszeit vor.

Es ist selbstverständlich, daß trotzdem die Versuchsbedingungen in den einzelnen Versuchen keine vollkommen gleichmäßige waren. Dafür ist die Durchblutungstechnik viel zu kompliziert. Störungen verschiedenster Art kommen auch bei großer Übung hin und wieder vor. Bald tritt eine Stromerschwerung ein, die eine Erhöhung des Druckes notwendig macht, welche wiederum leicht zu Blutungen führt, bald ist die Arterialisierung aus irgend einem Grunde zeitweilig keine ganz vollkommene, bald tritt irgend eine andere unvorhergesehene Störung auf.

In allen Fällen trat aber das Blut in kontinuierlichem Strahle aus der Leber aus, wobei allerdings die Strömungsgeschwindigkeit zwischen etwa 70 bis 80 ccm und weit über 100 ccm pro Minute schwankte. Auch der erforderliche Druck war — kurz vor Eintritt des Blutes in die Leber gemessen — recht verschieden. Betrug er im allgemeinen etwa 35 bis 45 mm Hg, so kamen doch einerseits Fälle vor, wo wir mit einem Drucke von 20 mm Hg auskamen, andererseits solche, wo wir den Druck bis auf 90 mm steigern mußten.

Es liegt auf der Hand, daß derartige unvermeidliche Ungleichheiten auf die Versuchsresultate einwirken müssen. Wir möchten hier nochmals mit besonderem Nachdruck betonen, worauf wir schon in der vorigen Arbeit hinwiesen: daß die Acetonbildung um so reichlicher erfolgt, je vollkommener der Versuch gelingt. Wir konnten diese Erfahrung bei der vorliegenden Untersuchung, wo die Acetonbildung zum Teil recht erhebliche Werte erreichte, mit noch größerer Sicherheit machen als in der voranstehenden Arbeit.

Waren dementsprechend auch die bei der Durchblutung mit derselben acetonbildenden Substanz gewonnenen Acetonwerte in den verschiedenen Versuchen zum Teil recht verschieden, so blieb es doch bei keiner Substanz im mindesten zweifelhaft, ob sie auf den Umfang der Acetonbildung einwirkte oder nicht.

Wir möchten hier bemerken, daß in den nachfolgenden Ausführungen sämtliche überhaupt mit den betreffenden Substanzen gewonnenen Resultate niedergelegt sind, mit Ausnahme von einigen wenigen Versuchen, die derartig mißlangen, daß sie vor ihrer Vollendung abgebrochen werden mußten, und bei denen dann die chemische Verarbeitung überhaupt nicht erfolgte.

Nur so glaubten wir mit Sicherheit jedes subjektive Moment bei der Beurteilung unserer Versuche ausschalten zu können.

Die Menge der zugefügten Substanz war nicht überall gleich, und zwar kamen in den anfänglichen Versuchen größere Substanzmengen (zum Teil 5 bis 6 g) zur Anwendung. Bald sahen wir aber, daß es zweckmäßiger ist, mit geringen Quantitäten zu arbeiten, und bei allen weiteren Versuchen wurden annähernd 2 g der zu untersuchenden Substanz hinzugefügt. Neutral reagierende Substanzen wurden in möglichst wenig Wasser oder, im Falle schwerer Löslichkeit, in Kochsalzlösung von 0,85 Proz. gelöst. Säuren wurden vor ihrem Zusatz mit so viel Natronlauge oder — in allen späteren Versuchen — so viel Ammoniak versetzt, daß die resultierende wässerige Lösung gegen Lackmus möglichst neutral reagierte.

Die Ausführung der Bestimmungen wurde nach Messinger-Huppert vorgenommen. In fast allen Fällen erfolgte die Bestimmung an dem Destillate aus 500 ccm des nach der Schenckschen Salzsäure-Sublimatmethode erhaltenen Filtrats. In einigen Fällen verbot es die Natur der zugefügten Substanz, die Destillation von vornherein aus saurer Lösung vorzunehmen. Die Flüssigkeit wurde dann neutralisiert und das zuerst gewonnene Destillat zur Beseitigung etwa übergegangenen Ammoniaks der nochmaligen Destillation aus saurer Lösung unterworfen. Auch das umgekehrte Verfahren (zunächst Destillation bei saurer, dann aus schwach alkalischer Reaktion) wurde in vereinzelten Fällen eingeschlagen.

Außer der Bestimmung der jodoformbildenden Substanz nach Messinger-Huppert haben wir in einer Reihe von Fällen bei vermehrter Bildung der flüchtigen, jodoformbildenden Substanz auch ihre Identifikation als Aceton durch Überführung in das Dibenzalaceton vorgenommen. Auch hier war die Ausbeute ebensowenig wie in den Versuchen der vorigen Arbeit jemals auch nur annähernd quantitativ, sie betrug aber stets ein Vielfaches von der in den Versuchen mit Blut ohne Zusatz unter den gleichen Bedingungen gewonnenen Menge Dibenzalaceton.

In nahezu sämtlichen Versuchen wurde die Bestimmung nach Messinger-Huppert nicht nur an dem zur Durchblutung benutzten Blut (Blut B), sondern auch an einer Quantität desselben Blutes vor der Durchblutung (Blut A) angestellt. In einigen wenigen Versuchen unterblieb die letztere Bestimmung leider versehentlich. Wir haben bei der Berechnung der in diesen Versuchen gebildeten Acetonmenge die Annahme gemacht, daß von 100 ccm Blut A 0,6 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung gebunden würden, ein Wert, der vielleicht um 0,2 bis 0,3 ccm zu hoch ist. Der hierdurch möglicherweise

bedingte Fehler ist aber so geringfügig, daß er für die Beurteilung der betreffenden Versuche als völlig belanglos angesehen werden kann. Bei den übrigen Versuchen geschah die Berechnung der neugebildeten Acetonmenge genau in derselben Weise, wie es in der vorigen Arbeit beschrieben wurde.

Wir werden bei der Aufführung der einzelnen Versuche der Einfachheit halber von einer Wiedergabe der Titrationszahlen absehen und uns mit der Angabe begnügen, wieviel Milligramm Aceton pro Liter Blut und wieviel im ganzen gebildet wurde. Bei der Geringfügigkeit des bei einer wohlgelungenen Durchblutung eintretenden Blutverlustes [1]) dürften auch die letztgenannten Zahlenangaben als ausreichend exakt anzusehen sein, wobei allerdings in Betracht zu ziehen ist, daß das in der Leber zurückgebliebene Aceton nur insoweit zur Berechnung kam, als es im Leberblut am Ende der Durchblutung enthalten war.

Hauptsächlich möchten wir aber bei der Beurteilung der Versuche die sicher zuverlässigen, auf das Liter Blut bezogenen Werte in Betracht ziehen. Hierbei müssen wir nur bemerken, daß die durch den zur Arterialisierung benutzten Luftstrom mitgeführten Acetonmengen, wie wir für eine Anzahl von Versuchen in der früher geschilderten Weise [2]) feststellten, bei der Bildung größerer Acetonmengen weit erheblicher sind als bei dem Auftreten geringerer Mengen. Sie betrugen in Versuchen, in denen die gebildete Acetonmenge die bei der Durchströmung mit normalem Blut auftretende nur um das Zwei- bis Vierfache übertraf, immerhin nur wenige Milligramm. Wo die Acetonbildung bis auf annähernd das Zehnfache der normalen anstieg, war der Acetonverlust durch den Luftstrom weit größer (er betrug maximal an 10 mg). Aber auch hier war er, im Vergleich zur gebildeten Acetonmenge, als geringfügig anzusehen, und wir werden in der vorliegenden ebensowenig wie in der vorausgehenden Arbeit die Acetonverluste durch den Luftstrom zu berücksichtigen haben.

Ehe wir nun an die Besprechung der einzelnen Versuche herantreten, wollen wir bemerken, daß wir sie nicht in der Reihenfolge, in der wir sie anstellten, anführen werden, auch nicht das Material überall nach der streng chemischen Zusammengehörigkeit zu ordnen gedenken, sondern nach Gesichtspunkten, die sich zum Teil erst bei der Erörterung der Versuche ergeben werden.

---

[1]) Siehe hierüber G. Embden, Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber. Diese Beiträge 6, 44 (1904).

[2]) G. Embden und F. Kalberlah, die voranstehende Arbeit.

3.

Almagia und Embden[1]) hatten schon die Beobachtung zu machen geglaubt, daß der Zusatz gewisser Aminosäuren zum Blute die Bildung flüchtiger, jodoformbildender Substanz in der Leber steigere.

Wir wollen zunächst dieser Beobachtung nachgehen und stellen daher in der folgenden Tabelle je zwei Versuche mit Glykokoll, Alanin, Glutaminsäure und einen Versuch mit Asparagin zusammen[2]).

Tabelle I.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebild. Menge Aceton mg	Bemerkungen
1	5 g Glykokoll in wenig Wasser	13	21	
1a	2 g Glykokoll in wenig Wasser	24	38	
2	6 g r-Alanin in 60 ccm Kochsalzlösung . . .	24	40	
3	5 g Alanin in 135 ccm Kochsalzlösung . . .	15	26	
4	2 g Glutaminsäure mit Ammoniak neutral. .	15	24	
5	2 g Glutaminsäure, mit Ammoniak neutral. .	23	37	In diesem und dem unmittelbar nachher angestellten Versuch 13 dass. Blut
6	etwa 5 g Asparagin in möglichst wenig Wasser gelöst	20	32	

Die pro Liter gebildete Acetonmenge schwankt zwischen 13 und 24 mg, die Acetonbildung hält sich also innerhalb derselben Grenzen wie in den in der vorigen Arbeit beschriebenen Versuchen mit Blut ohne Zusatz. (Die entsprechenden Werte schwankten hier zwischen 12 und 27 mg.)

[1]) Almagia und Embden, Über das Auftreten einer flüchtigen jodoformbildenden Substanz bei der Durchblutung der Leber. Diese Beiträge 6, 59 (1904).

[2]) In den Versuchen 1 bis 5 gelangten von Kahlbaum bezogene, im Versuch 6 ein Präparat von Merck zur Anwendung.

Zu einem ganz anderen Ergebnis gelangten wir aber, als wir statt der eben besprochenen Aminosäuren dem Durchblutungsblut reines aktives Leucin hinzufügten[1]).

Tabelle II.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebild. Menge Aceton mg	Bemerkungen
7	6 g aktives Leucin in 200 ccm heißer Kochsalzlösung gelöst . .	54	92	Dauer der Durchblutung 90 Minuten
8	6 g aktives Leucin in 250 ccm heißer Kochsalzlösung	50	88	
9	5 g Leucin in etwa 200 ccm Kochsalzlösung	55	99	
10	2 g Leucin in 200 ccm Kochsalzlösung 1400 ccm Blut . . .	93	149	Zur Durchblutung wurde dasselbe Blut wie in Versuch 15 benutzt

Aus der vorstehenden Tabelle 2 geht nämlich hervor, daß die Acetonbildung in den Versuchen 7 bis 9 auf annähernd das Doppelte, in Versuch 10 auf das Drei- bis Vierfache der in den bisherigen Versuchen beobachteten Maximalwerte anstieg.

Auch durch die bei der Darstellung des Dibenzalacetons erhaltene Ausbeute überzeugten wir uns, daß es sich wirklich um eine vermehrte Acetonbildung handelte.

Konnte es sonach keinem Zweifel unterliegen, daß unter dem Einfluß des Zusatzes von Leucinlösung die Acetonbildung in der isolierten Leber stark vermehrt wurde, so blieb doch der Chemismus dieser Einwirkung zunächst unklar.

Sofort ließ sich die Möglichkeit ausschalten, daß etwa nur die große Flüssigkeitsmenge, die zur Lösung des Leucins erforderlich war, bzw. die durch Zusatz dieser Flüssigkeitsmenge bedingte Blutverdünnung die gesteigerte Acetonbildung verursachte.

[1]) Das Leucin wurde von uns selbst durch Salzsäurespaltung von Kaseïn gewonnen.

Es ließ sich leicht feststellen, daß bloße Blutverdünnung mit ähnlichen Mengen physiologischer Kochsalzlösung, wie sie in den Versuchen 7 bis 10 angewandt wurden, ohne Einwirkung auf den Umfang der Acetonbildung ist. Letztere betrug in einem Versuche, wo den 1600 ccm Blut etwa 300 ccm physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt wurden, 14 mg pro Liter.

Betrachtet man die Formel des Leucins:

$$\begin{array}{c} CH_3 \quad CH_3 \\ \diagdown\ \diagup \\ CH \\ CH_2 \\ CHNH_2 \\ COOH \end{array}$$

so erscheint es freilich von vornherein im höchsten Grade wahrscheinlich, daß das nach seinem Zusatz zum Durchblutungsblut reichlich auftretende Aceton der Isopropylgruppe der genannten Aminosäure entstammt.

Wenn dies wirklich der Fall war, mußte die gesteigerte Acetonbildung eben an das Vorhandensein dieser Isopropylgruppe gebunden sein, sie mußte ausbleiben bei Durchströmung mit der dem Leucin isomeren α-Aminonormalcapronsäure:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ CH_2 \\ CH_2 \\ CH_2 \\ CHNH_2 \\ COOH \end{array}$$

Tabelle III.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebild. Menge Aceton mg	Bemerkungen
11	2 g α-Aminonormalcapronsäure in 200 ccm Kochsalzlösung . . .	23	41	
12	2 g α-Aminonormalcapronsäure in 150 ccm Kochsalzlösung . . .	20	35	Dieser Versuch wurde mit demselben Blut wie Versuch 16 vorgenommen

Die Resultate der Versuche 11 und 12, in denen die Durchblutung mit der letzteren Substanz[1]) vorgenommen wurden, lieferten in der Tat den Beweis, daß die Steigerung der Acetonbildung ausbleibt, wenn die Isopropylgruppe fehlt:

In beiden Versuchen liegen die Acetonwerte innerhalb der Zahlengrenzen, die bei der Durchströmung mit normalem Blute ermittelt wurden.

Freilich mußte bei einer Vergleichung der Leucinversuche mit den unter Zusatz von α-Aminonormalcapronsäure angestellten berücksichtigt werden, daß das verwandte Leucin optisch aktiv, die zur Anwendung gelangte α-Aminonormalcapronsäure inaktiv war. Doch stellte sich heraus, daß die optische Aktivität keineswegs für das Zustandekommen gesteigerter Acetonbildung erforderlich ist, wie aus nachfolgendem Versuch mit racemischem Leucin, in welchem die Acetonbildung in ganz ähnlichem Umfange wie in den Versuchen 7 bis 9 erfolgte, hervorgeht.

Versuch 13:

Durchblutung mit 1,7 g synthetischem Leucin[2]) in 120 ccm physiologischer Kochsalzlösung: Gebildete Menge Aceton pro Liter Flüssigkeit 55 mg, im ganzen gebildete Acetonmenge 95 mg. (Zu diesem und dem unmittelbar vorher angestellten Versuch 5 wurde dasselbe Blut benutzt.)

War durch die vorhergehenden Versuche auch der Beweis erbracht worden, daß das bei Durchblutung mit Leucin vermehrt auftretende Aceton der Isopropylgruppe des Leucins entstammte, so waren damit doch die zur Acetonbildung führenden Abbauvorgänge am Leucin noch keineswegs völlig aufgeklärt.

Ehe wir in eine Erörterung der verschiedenen hier vorhandenen Möglichkeiten eintreten, müssen wir eine Reihe weiterer Versuche besprechen.

Es lag zunächst sehr nahe, zu versuchen, ob ebenso wie das Leucin auch das nächst niedere Homologon des letzteren, die α-Aminoisovaleriansäure, Aceton bildete, zumal das Vorkommen auch dieser Aminosäure im Eiweißmolekül ein weit verbreitetes ist.

Wir haben derartige Versuche bisher nur mit dem synthetisch

---

[1]) Die Substanz war aus α-Bromnormalkapronsäure und Ammoniak nach dem Verfahren von Hüfner in der Fabrik von Schuchardt in Görlitz gewonnen worden.

[2]) Das Präparat wurde durch Herrn Dr. Darmstädter aus Isovaleraldehyd, Blausäure und Ammoniak über das Nitril in der bekannten Weise dargestellt. Der Schmelzpunkt betrug bei raschem Erhitzen im zugeschmolzenen Rohre 290°.

gewonnenen Racemkörper[1]) angestellt, was aber nach dem Ergebnis von Versuch 13 das Versuchsresultat nicht beeinträchtigen konnte.

Die Versuche sind in der folgenden Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebild. Menge Aceton mg	Bemerkungen
14	2 g α-Aminoisovaleriansäure in wenig Wasser	27	43	
15	Dasselbe	12	19	Zu diesem und dem unmittelbar vorher angestellten Versuch 10 dass. Blut
16	Dasselbe	11	18	Zu diesem und dem unmittelbar vorher angestellten Versuch 12 dass. Blut

Ganz im Gegensatz zum Leucin bildet also die α-Aminoisovaleriansäure in der überlebenden Leber kein Aceton.

Wenn man annimmt — und wir wollen diese Annahme einstweilen machen —, daß der Abbau des Leucins und der Abbau der dem Leucin so ähnlichen Aminovaleriansäure unter den gleichen Umständen nach gleichen Gesetzen sich vollzieht, so lassen sich aus dem Auftreten von Aceton beim Leucinabbau und aus dem Fehlen der Acetonbildung beim Abbau der Aminoisovaleriansäure bereits gewisse Schlußfolgerungen bezüglich der Art der Umwandlung dieser beiden Aminosäuren in der Leber ziehen.

Ein Blick auf die beiden nachstehenden Formeln:

$$\begin{array}{ccc} CH_3 \quad CH_3 & \qquad & CH_3 \quad CH_3 \\ \diagdown\diagup & & \diagdown\diagup \\ CH & & CH \\ CH_2 & & CHNH_2 \\ CHNH_2 & & COOH \\ COOH & & \text{Aminovaleriansäure} \\ \text{Leucin} & & \end{array}$$

[1]) Die Versuche 14 und 15 wurden mit einem Präparat angestellt, für dessen gütige Überlassung wir Herrn Geheimrat Emil Fischer zu besonderem Danke verpflichtet sind, Versuch 16 mit einem von Kahlbaum bezogenen.

lehrt, daß weder eine successive Abspaltung der Kohlenstoffatome vom Carboxylende her, noch eine primäre Spaltung zwischen α- und β-C-Atom das Verhalten beider Substanzen bezüglich der Acetonbildung in der Leber erkären können. In beiden Fällen müßte die Aminoisovaleriansäure ebenso wie das Leucin, ja eher noch Aceton bilden.

Am einfachsten wäre, worauf bereits bezüglich des Leucins von Noorden und Embden[1]) hingewiesen haben, die Annahme einer primären Spaltung zwischen β- und γ-C-Atom. Diese würde in der Tat beim Leucin, nicht aber bei der Aminovaleriansäure zur Acetonbildung führen.

Aber die eben erwähnte Möglichkeit war nicht die einzige.

Wenn schon durch ältere Untersuchungen bekannt war, daß Phenylpropionsäure und Zimtsäure im Tierkörper in Benzoesäure bezw. Hippursäure übergehen, so konnte Knoop[2]) in seiner Arbeit über den Abbau der aromatischen Fettsäuren im Tierkörper den Nachweis führen, daß an Hunde verfütterte γ-Phenylbuttersäure zu Phenylessigsäure abgebaut wird und als Phenacetursäure im Harn erscheint, während das nächst höhere Homologon, die δ-Phenylvaleriansäure, wiederum in Hippursäure übergeht. In den eben besprochenen Fällen, sowie auch bei dem ebenfalls von Knoop beobachteten Übergang von Phenyl-β-Milchsäure und Benzoylessigsäure in Hippursäure, von Benzoylpropionsäure und Phenylisocrotonsäure in Phenacetursäure tritt beim Abbau der Seitenkette deren Spaltung überall zwischen α- und β-C-Atom ein. Bei der soeben von uns für das Leucin und die Aminovaleriansäure gemachten Annahme würde es sich aber um eine Spaltung zwischen β- und γ-C-Atom handeln.

Sicherlich war es nicht berechtigt, den Abbau aromatisch substituierter Fettsäuren und die Umwandlungen aliphatischer Aminosäuren ohne weiteres miteinander in Parallele zu setzen. Um so mehr mußte es unsere Aufgabe sein, der Ursache des verschiedenartigen Verhaltens beider Körpergruppen nachzugehen.

In erster Linie mußte untersucht werden, ob etwa die Eigenschaft der Aminosäuren als solcher — d. h. die Substitution eines Wasserstoffatoms am α-Kohlenstoffatom durch die Aminogruppe — irgendwie bestimmend auf die Art des Abbaus einwirkte.

---

[1]) Carl v. Noorden und Gustav Embden, Einige Probleme des intermediären Kohlehydratstoffwechsels. Zentralblatt für die gesamte Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels, I. Jahrg, Heft 1, S. 4.

[2]) Knoop, Fr., Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Diese Beiträge 6, 150.

Zur Entscheidung dieser Frage nahmen wir Versuche mit den dem Leucin und der Aminovaleriansäure entsprechenden Fettsäuren, der Isobutylessigsäure und der Isovaleriansäure [1]), vor. Die Resultate dieser Versuche sind aus Tabelle V ersichtlich.

Tabelle V.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebild. Menge Aceton mg	Bemerkungen
17	2 g Isobutylessigsäure mit NH_3 neutralisiert	15	24	Zu diesem und dem Versuch 18 dasselbe Blut
18	Dasselbe	24	38	
19	2 g Isovaleriansäure mit NH_3 neutralisiert . .	73	117	Zu diesem und dem Versuch 19 dasselbe Blut
20	Dasselbe	73	117	

Wie man sieht, verhalten sich die beiden Fettsäuren gerade umgekehrt wie die ihnen entsprechenden Aminosäuren. Die dem Leucin entsprechende Isobutylessigsäure bildet kein Aceton, die der Aminovaleriansäure entsprechende Isovaleriansäure erweist sich als ein kräftiger Acetonbildner.

Die letztere Substanz folgt also bei ihrem Abbau, wenigstens was den Ort der Kettensprengung anlangt, demselben Gesetze wie die verschiedenen erst aufgeführten aromatischen Fettsäuren in den Versuchen Knoops, d. h. die Spaltung der Kette findet zwischen α- und β-C-Atom statt.

Machen wir für die in ihrem Bau der Isovaleriansäure so ähnliche Isobutylessigsäure die Annahme, daß auch ihr Abbau unter Spaltung zwischen α- und β-C-Atom erfolge, so würde intermediär aus ihr Isobuttersäure entstehen. Ist diese Annahme richtig, so darf auch aus Isobuttersäure kein Aceton bei der Durchblutung gebildet werden.

In der Tat zeigten uns zwei übereinstimmende, in Tabelle VI aufgeführte Versuche, daß Isobuttersäure kein Acetonbildner ist.

[1]) Beide Substanzen waren von Kahlbaum bezogen. Von ihrer Reinheit überzeugten wir uns durch die Siedepunktsbestimmung.

Tabelle VI.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
21	3 g Isobuttersäure mit NH_3 neutralisiert	16	26	—
22	6 g Isobuttersäure mit Natronlauge neutralisiert . .	8	13	—

Die drei Homologen Isobuttersäure, Isovaleriansäure und Isobutylessigsäure [1]) verhalten sich also bezüglich ihrer Fähigkeit, Aceton zu bilden, genau so, wie sie sich verhalten müssen, wenn der Tierkörper ihre Ketten in derselben Weise angreift wie die Seitenketten der oben genannten aromatischen Fettsäuren, und wir dürfen aus diesem Verhalten die Berechtigung entnehmen, die von Knoop an aromatischen Fettsäuren beobachtete Gesetzmäßigkeit auch auf rein aliphatische Fettsäuren, zunächst auf solche mit verzweigter Kette, zu übertragen.

Wie aber ist die Tatsache zu erklären, daß das Leucin und die Aminoisovaleriansäure in völlig anderer Weise abgebaut werden wie die ihnen entsprechenden Fettsäuren?

Bei weitem am meisten scheint uns folgende Vorstellung allen bisher bekannten Erscheinungen gerecht zu werden: Das Leucin und die Aminoisovaleriansäure werden zunächst unter Abspaltung ihrer Carboxylgruppe in Substanzen mit einem Kohlenstoffatom weniger übergeführt. Ob das Leucin nach der wohl sicher auftretenden Desamidierung durch Oxydation seines α-C-Atoms zur Isovaleriansäure, die Aminoisovaleriansäure zur Isobuttersäure wird, oder ob nur die Vorstufen dieser Fettsäuren — aus Leucin also etwa Isoamylalkohol oder Isovaleraldehyd — gebildet werden, darüber möchten wir einstweilen eine bestimmte Anschauung nicht äußern, wenn uns auch die intermediäre Bildung der Fettsäuren selbst von vornherein am wahrscheinlichsten erscheint. Wie dem aber auch sein mag, jedenfalls folgt der weitere Abbau der ge-

[1]) Über Versuche mit Isoamylessigsäure und Isoamylaminoessigsäure hoffen wir demnächst berichten zu können.

nannten Aminosäuren nach der Carboxylabspaltung demselben Gesetz wie jener der Fettsäuren.

Das Leucin würde also nach Abspaltung seines Carboxyls ebenso abgebaut werden wie die Isovaleriansäure, die Aminoisovaleriansäure ebenso wie die Isobuttersäure. Deswegen bildet bei Durchströmung der Leber das Leucin — wie die Isovaleriansäure — Aceton, wogegen unter den gleichen Umständen Aminoisovaleriansäure ebensowenig wie Isobuttersäure Aceton entstehen läßt.

Eine ganze Reihe bekannter Tatsachen läßt sich zur Stützung der eben geäußerten Anschauung anführen.

Hierher gehören die Entstehung von Taurin aus Cystin bzw. Cystein im normalen Tierkörper [1]), die Bildung von Kadaverin aus Lysin, von Putrescin aus Ornithin (bzw. Arginin) im Organismus des Cystinurikers [2]) und bei der peptischen Verdauung das gleichfalls bei der peptischen und auch bei der tryptischen Verdauung beobachtete Entstehen von Oxyphenyläthylamin aus Tyrosin (Emerson, Langstein), die Bildung von Homogentisinsäure aus Tyrosin [3]) und Phenylalanin [4]), die wir mit Neubauer und Falta [5]) durchaus für einen Vorgang des normalen intermediären Stoffwechsels halten möchten. Gerade die Bildung von Homogentisinsäure aus Tyrosin und Phenylalanin ist ein Beispiel nicht nur für die Abspaltung eines Carboxyls aus einer Aminosäure, sondern auch für die Umwandlung einer Aminosäure in eine Fettsäure mit einem Kohlenstoffatom weniger.

Mit diesen am tierischen Organismus und mit tierischen Fermenten gewonnenen Erfahrungen stimmen überdies die Resultate rein chemischer Untersuchungen sehr wohl überein.

So gelang es Emil Fischer [6]), bei der Oxydation von Phenylalanin mit Schwefelsäure und Bichromat Phenylacetaldehyd, bei der Oxydation von Alanin mit Schwefelsäure und Permanganat Acetaldehyd nachzuweisen.

---

[1]) G. v. Bergmann, Diese Beiträge 4, 193.

[2]) A. Löwy und C. Neuberg, Über Cystinurie, 1. Mitteil. Zeitschr. f. physiol. Chem. 43, 352 ff. (1904).

[3]) Wolkow und Baumann, Über das Wesen der Akaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 266 (1891); Heinrich Embden, Beiträge zur Kenntnis der Akaptonurie, 2. Mitteil. daselbst 18, 314 (1894).

[4]) W. Falta und L. Langstein, Die Entstehung von Homogentisinsäure aus Phenylalanin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 513 (1902 bis 1903).

[5]) O. Neubauer und W. Falta, Über das Schicksal einiger aromatischer Säuren bei der Alkaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 96 (1904).

[6]) E. Fischer, Über die Hydrolyse des Kaseins durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 174 (1901).

Hierher gehören namentlich auch die Untersuchungen von Neuberg und Blumenthal[1]), welche bei Behandlung von Gelatine mit saurem Wasserstoffsuperoxyd und Ferrosulfat Isovaleraldehyd und Aceton erhielten, die Herkunft des Isovaleraldehyds aus dem Leucinkomplex der Gelatine vermuteten und auch auf die Möglichkeit hinwiesen, daß das von ihnen beobachtete Aceton dem Leucin oder seinen Umwandlungsprodukten, welche die Atomgruppierung $\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!C\ldots$ besitzen, entstammte. Sie bemerkten ferner in ihrer Arbeit, daß bei der zum Isovaleraldehyd gehörigen Säure, eben der Isovaleriansäure, nach einer Beobachtung von Miller[2]) die Oxydation am β-Kohlenstoffatom angreife: Man könne „z. B. leicht zur Oxyisovaleriansäure gelangen, deren Übergang in Aceton schon eher begreiflich erscheint“[3]).

Es erscheint also auch vom rein chemischen Standpunkte sehr wahrscheinlich, daß die Umwandlung von Aminosäuren in stickstofffreie Substanzen mit einem Kohlenstoffatom weniger (aller Voraussicht nach in Fettsäuren) nicht auf wenige Aminosäuren beschränkt, sondern ein recht weit verbreiteter Vorgang ist.

Es lag nahe, diese Frage noch besonders an einer Aminosäure zu prüfen, die unter Carboxylabspaltung, Desamidierung und Oxydation der bei der Desamidierung entstehenden Alkoholgruppe direkt in Aceton übergehen könnte, nämlich an der α-Aminoisobuttersäure.

Freilich war von vornherein diese Aminosäure, die bekanntlich bisher als Eiweißspaltungsprodukt nicht nachgewiesen wurde, mit den gewöhnlichen α-Aminosäuren des Eiweißmoleküls nicht völlig vergleichbar, schon weil in ihr das Stickstoffatom an ein tertiäres Kohlenstoffatom gebunden ist; die an ihr gewonnenen Versuchsresultate waren dementsprechend auch nicht ohne weiteres auf andere Aminosäuren übertragbar.

Außer mit der Aminobuttersäure[4]) wurden auch mit der desamidierten Aminoisobuttersäure, der Oxyisobuttersäure[5]), Versuche angestellt.

---

[1]) F. Blumenthal und C. Neuberg, Über Entstehung von Aceton aus Eiweiß. Deutsch. med. Wochenschr. 1901, S. 6. Dieselben, Über die Bildung von Isovaleraldehyd und Aceton aus Gelatine. Diese Beiträge 2, 238 (1902).

[2]) Miller, Ann. d. Chem. 200, 273 (zitiert nach Neuberg und Blumenthal).

[3]) Zitiert nach Neuberg und Blumenthal, a. a. O. S. 249.

[4]) Die Aminoisobuttersäure stellten wir vom Acetoncyanhydrin aus in der bekannten Weise dar.

[5]) Das von Kahlbaum bezogene Präparat schmolz im zugeschmolzenen Röhrchen bei 78 bis 79°.

Tabelle VII.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
23	1,5 g α-Aminoisobuttersäure . .	17	27	
24	1,5 g α-Aminoisobuttersäure . .	24	38	Zu diesem und dem Versuch 36a dasselbe Blut
25	2 g Oxyisobuttersäure mit NH_3 neutralisiert . .	25	40	
26	2 g Oxyisobuttersäure mit NH_3 neutralisiert . .	28	45	

Das Ergebnis dieser Versuche ist aus Tabelle VII zu ersehen. Beide Substanzen hatten keinen merklichen Einfluß auf den Umfang der Acetonbildung. (In Versuch 26 überschreitet die pro Liter neu gebildete Menge Aceton die in Leerversuchen maximal beobachtete nur um 1 mgr.) Diese Tatsache gestattet aber, wie bereits oben erwähnt, keinerlei Rückschlüsse auf das Verhalten von Aminosäuren, in denen der Stickstoff an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist.

Wenn die oben entwickelten Vorstellungen über den Abbau der aus dem Eiweißmolekül stammenden aliphatischen Monaminomonocarbonsäuren — und nur von diesen ist zunächst hier die Rede — richtig sind, wenn also diese Substanzen nach ihrer Umwandlung in Fettsäuren dieselben Schicksale erleiden wie die Fettsäuren überhaupt, so werden damit für die Beurteilung einiger weiterer Fragen des intermediären Stoffwechsels neue Gesichtspunkte gewonnen. Die Beziehungen zwischen Aminofettsäuren und Fettsäuren erscheinen nunmehr als so enge, daß die Rolle, die diese beiden Gruppen von Körpern im Haushalte des tierischen Organismus spielen, aller Voraussicht nach in vielen Punkten eine sehr ähnliche ist.

Dies gilt namentlich auch für die Frage nach der Herkunft der im Organismus gebildeten Kohlehydrate.

Der gerade augenblicklich wiederum so lebhaft entbrannte Streit, ob der Tierkörper aus Eiweißsubstanzen (d. h. im wesentlichen aus Aminosäuren) oder aus Fetten (d. h. im wesentlichen aus Fettsäuren) das Material zur Zuckerbildung entnimmt, muß an

Schärfe wesentlich verlieren, wenn man sieht, daß der Abbau der Aminosäuren mit ihrer Verwandlung in Fettsäuren beginnt. Und die namentlich auf Grund klinischer Beobachtung von Zuckerkranken von verschiedenen Autoren (C. von Noorden, Th. Rumpf) schon längere Zeit gewonnene Anschauung, daß Fette sowohl wie Eiweißkörper Kohlehydrat bilden können, muß erhöhte Geltung gewinnen.

Der Abbau der Fettsäuren — und damit auch jener der Aminofettsäuren nach der Carboxylabspaltung und Desamidierung — ist allem Anscheine nach, wie das bereits für die aromatischen Fettsäuren von Knoop in seiner mehrfach erwähnten Arbeit entwickelt wurde, beherrscht von einem Vorgange, den Knoop als Oxydation in β-Stellung auffaßt.

Hierbei kommt es unter Carboxylbildung am β-C-Atom zur Sprengung der Kette zwischen α- und β-C-Atom, und es wird allem Anscheine nach vom Fettsäuremolekül eine Säure mit zwei Kohlenstoffatomen abgespalten.

Welcher Art diese Säure auch sein mag (ob z. B. primär Essigsäure, Glykolsäure oder Glyoxylsäure auftritt), jedenfalls dürften derartige Substanzen im Augenblick ihrer Bildung außerordentlich synthesenfähig sein [1]), und vielleicht sind es gerade diese beim Abbau entstandenen Ketten [2]) von zwei Kohlenstoffatomen, die der Tierkörper als Material bei verschiedenen Aufbauvorgängen, z. B. bei der Synthese des Traubenzuckers, benutzt.

4.

Durch Magnus-Levy [3]) ist der exakte Beweis erbracht worden, daß l-β-Oxybuttersäure im Tierkörper Aceton bilden kann.

---

[1]) Siehe hierüber auch Knoop: Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Habilitationsschrift, Freiburg i. B. 1904, S. 8.

[2]) Glykokoll würde bereits durch einfache Desamidierung in Glykolsäure, Alanin durch Desamidierung, Kohlensäureabspaltung und Oxydation in Essigsäure übergehen, worin ein vollkommenes Analogon zum Verhalten der Seitenkette bei der Umwandlung von Phenylalanin in Homogentisinsäure gegeben wäre. Hierbei könnte genau wie bei dem oben erwähnten Oxydationsversuch Emil Fischers intermediär Acetaldehyd — vielleicht auch Äthylalkohol — auftreten, deren Bildung übrigens auch bei dem Abbau anderer Aminosäuren und auch bei den mehr als dreigliedrigen Fettsäuren keineswegs ausgeschlossen erscheint. Ähnliches gilt voraussichtlich auch für die als Kohlehydratspaltungsprodukt gebildete Milchsäure, wie bereits früher von Magnus-Levy hervorgehoben wurde.

[3]) Magnus-Levy, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmatologie 42, 149.

Wir haben untersucht, ob diese Substanz auch in der isolierten Leber Aceton bildet[1]).

Über die Resultate dieser Versuche gibt Tabelle VIII Auskunft.

Tabelle VIII.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
27	3,5 g l-β-Oxybuttersäure mit NH_3 neutralisiert	269	430	
28	Etwa 3,5 g l-β-Oxybuttersäure m. Natronlauge neutralisiert .	129	206	Verlauf durch starke Blutung gestört.
29	3 g l-β-Oxybuttersäure mit Natronlauge neutralisiert . . .	262	419	
30	3 g l-β-Oxybuttersäure mit Ammoniak neutralisiert . . .	123	197	

Wie man sieht, ist β-Oxybuttersäure auch in der isolierten Leber ein mächtiger Acetonbildner.

Die Menge des in den Versuchen 27 und 29 entstandenen Acetons übertrifft die in Versuchen mit normalem Blute maximal gebildete um annähernd das Zehnfache.

Dagegen fand in einem Versuche, in dem die Muskulatur (beide Hinterschenkel eines Hundes) mit einer ähnlichen Menge β-Oxybuttersäure in Form ihres Natronsalzes während 90 Minuten durchblutet wurde, keine nachweisbare Acetonbildung statt. (Versuch 31.)

Die Durchströmung gelang vorzüglich. Die Muskulatur war am Ende des Versuches noch mechanisch erregbar. Es scheint also, als ob die Umwandlung von β-Oxybuttersäure in Aceton ein nicht in allen Organen sich abspielender Prozeß ist.

[1]) Die Darstellung der β-Oxybuttersäure erfolgte nach den Vorschriften von Magnus-Levy aus Diabetikerharn, doch war die von uns verwandte Säure nicht kristallisiert.

Nach einer namentlich von Knoop[1]) auf Grund seiner Resultate mit aromatischen Fettsäuren, insbesondere mit γ-Phenylbuttersäure betonten Anschauung könnte β-Oxybuttersäure vielleicht durch Oxydation von Buttersäure entstehen.

Die Ergebnisse zweier von uns mit Normalbuttersäure[2]) angestellter Versuche sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Tabelle IX.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
32	2 g Normalbuttersäure mit NH_3 neutralisiert	148	237	
32a	2 g Normalbuttersäure mit NH_3 neutralisiert	108	173	

Aus den Versuchen 32 und 32a geht hervor, daß auch die Buttersäure Aceton bildet[3]), wohl zweifellos unter intermediärem Auftreten von β-Oxybuttersäure.

Ist sonach sicherlich die von Knoop vermutete Analogie in dem Verhalten der Phenylbuttersäure und der Buttersäure wirklich vorhanden, insofern bei beiden Substanzen die Oxydation am β-C-Atom angreift, so unterscheiden sich doch die Phenylbuttersäure in den Fütterungsversuchen Knoops und die Buttersäure in unseren Durchblutungsversuchen in einem Punkte sehr wesentlich. Die Phenylbuttersäure wurde zur Phenylessigsäure, einer Substanz mit einer zweigliedrigen Seitenkette, abgebaut, die Buttersäure ward zum dreigliedrigen Aceton.

Wie dieses verschiedene Verhalten beider Substanzen unter so verschiedenen Versuchsbedingungen zu erklären ist, steht einstweilen dahin.

[1]) Knoop, diese Beiträge 6, 161 und Habilitationsschrift, S. 40.

[2]) Es gelangte das reinste bei Kahlbaum käufliche Präparat zur Anwendung. Der Siedepunkt lag zwischen 164 bis 165°.

[3]) Das Verhalten der höheren Homologen der Essigsäurereihe wird den Gegenstand einer besonderen Untersuchung bilden.

Die Möglichkeit, daß beim Abbau der Phenylbuttersäure zur Phenylessigsäure intermediär Methylbenzylketon, $C_6H_5CH_2COCH_3$, gebildet wird, erscheint uns von vornherein geringer [1]) als die ebenfalls vorhandene Möglichkeit, daß die Bildung von Aceton aus Buttersäure in der durchbluteten Leber gleichsam ein pathologischer, durch die abnormen Ernährungsverhältnisse der Leber bedingter Vorgang ist.

Wissen wir doch, daß in krankhaften Zuständen, wie namentlich beim Diabetes mellitus, und auch unter gewissen abnormen Ernährungsbedingungen, allem Anscheine nach der Abbau der β-Oxybuttersäure gestört ist.

Vielleicht beruht eben das Wesen dieser zur Ausscheidung von Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Aceton führenden Störung darin, daß der Organismus die Fähigkeit (wenigstens zum Teil) eingebüßt hat, die Spaltung der β-Oxybuttersäure zwischen α- und β-C-Atom, die zur Bildung zweier Moleküle der leicht verbrennlichen Essigsäure führen könnte, zu vollziehen.

5.

Gelegentlich unserer Untersuchungen über den Einfluß von Aminosäuren auf die Acetonbildung in der künstlich durchbluteten Leber unternahmen wir auch einen Versuch mit l-Tyrosin.

Zu unserer Überraschung rief diese Substanz eine sehr beträchtliche Steigerung der Acetonbildung hervor. Eine Wiederholung des Versuches führte zu dem gleichen Ergebnis.

Die Resultate der Tyrosinversuche gehen aus Tabelle X hervor [2]).

In Versuch 33 wurde auch das Dibenzalaceton aus dem Destillat von 3000 ccm des nach Schenk gewonnenen Blutfiltrates (entsprechend 500 ccm Blut) dargestellt. Die Ausbeute betrug annähernd 0,05 g, war also zweieinhalbmal größer als in den Versuchen mit normalem Blut, so daß an der Acetonnatur der gebildeten flüchtigen jodoformbildenden Substanz kein Zweifel bestehen konnte.

Ganz ebenso wie das Tyrosin verhielt sich auch das racemische Phenylalanin, mit dem wir, da der zweite Versuch durch Versagen der Arterialisierungsvorrichtung schlecht gelungen war, drei Versuche anstellten [3]). (Tabelle XI.)

[1]) Immerhin gedenken wir einen Fütterungsversuch mit Methylbenzylketon auszuführen.

[2]) Für die beiden Versuche kamen zwei verschiedene, von uns selbst durch Hydrolyse von Kasein dargestellte, völlig reine Präparate zur Anwendung.

[3]) Auch das Material zu diesen Versuchen verdanken wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Geheimrat Emil Fischer.

Tabelle X.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
33	2,5 bis 3,0 g Tyrosin in 300 ccm heißer Kochsalzlösung .	104	198	
34	annähernd 2,5 g Tyrosin in 350 ccm heißer Kochsalzlösung	68	133	

Tabelle XI.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
35	3 g Phenylalanin in 135 ccm physiol. Kochsalzlösung .	71	123	
36	2 g Phenylalanin in 190 ccm physiol. Kochsalzlösung .	37	66	Sehr mangelhafte Arterialisierung
36a	2 g Phenylalanin in 200 ccm physiol. Kochsalzlösung .	88	158	

Auch das desamidierte Phenylalanin, die β-Phenyl-α-Milchsäure[1]), steigerte in unzweifelhafter Weise die Acetonbildung, wenn auch weniger kräftig als Tyrosin und Phenylalanin (Tabelle XII).

Den drei zuletzt besprochenen Substanzen: Tyrosin, Phenylalanin und Phenyl-α-Milchsäure, ist gemeinsam, daß der in ihnen enthaltene aromatische Kern im Organismus verbrennlich ist[2]).

[1]) Das Präparat wurde in der chemischen Fabrik von Dr. Theodor Schuchardt dargestellt, es schmolz bei 95 bis 96°.

[2]) Für das Tyrosin und das Phenylalanin ist das schon längere Zeit bekannt, für die Phenyl-α-Milchsäure wurde die totale Verbrennlichkeit erst kürzlich — zuerst von Knoop, diese Beiträge 6, 157 — festgestellt.

Tabelle XII.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
37	2 g β-Phenyl-α-Milchsäure mit NH_3 neutralisiert	45	72	Zur Durchblutung dasselbe Blut wie in Versuch 40.
38	2 g β-Phenyl-α-Milchsäure mit NH_3 neutralisiert	52	83	

Unsere nächste Aufgabe war es daher, festzustellen, ob die Fähigkeit aromatischer Substanzen, eine Steigerung der Acetonbildung in der Leber zu bewirken, an die Verbrennlichkeit des aromatischen Kernes im Tierkörper gebunden ist.

Wir haben daher eine Reihe von Versuchen mit Substanzen angestellt, die in ihrem Bau den eben besprochenen ähnlich sind, sich aber biologisch durch die Unangreifbarkeit des Benzolkernes von ihnen wesentlich unterscheiden.

Unsere Versuche erstreckten sich zunächst auf die β-Phenyl-β-Milchsäure, die Phenylessigsäure, die Phenylpropionsäure und die Zimtsäure.

Aus Tabelle XIII geht hervor, daß alle diese Substanzen ohne Einfluß auf die Acetonbildung in der Leber sind.

Unter den neun Versuchen der Tabelle XIII zeigt nur einer von drei Phenylpropionsäureversuchen (Versuch 44) eine etwas stärkere Acetonbildung, als sie in den Versuchen mit normalem Blute beobachtet wurde; doch lassen die Resultate der technisch ausgezeichnet gelungenen Versuche 43 und 45 keinen Zweifel darüber, daß die Phenylpropionsäure kein Acetonbildner ist.

Die Lehre vom Abbau der aromatischen Aminosäuren hat in den letzten Jahren namentlich durch die von Neubauer und Falta in einem Falle von Alkaptonurie[1]) ausgeführten Untersuchungen sehr wesentliche Förderung erfahren.

Ohne im einzelnen auf die Resultate dieser Arbeit einzugehen, wollen wir hier nur auf die wichtigsten Vorstellungen hinweisen,

[1]) O. Neubauer und W. Falta, Über das Schicksal einiger aromatischer Säuren bei der Alkaptonurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 96 (1904).

Tabelle XIII.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
39	2 g β-Phenyl-β-Milchsäure mit NH_3 neutralisiert	20	32	
40	2 g β-Phenyl-β-Milchsäure mit NH_2 neutralisiert	28	45	Dasselbe Blut wie in Versuch 38
41	4 g Phenylessigsäure mit NH_3 neutralisiert . . .	17	27	
42	2 g Phenylessigsäure mit NH_3 neutralisiert . . .	19	30	Dasselbe Blut wie in Versuch 45
43	4 g Phenylpropionsäure mit NH_3 neutralisiert . . .	20	32	
44	2 g Phenylpropionsäure mit NH_3 neutralisiert . . .	33	53	
45	2 g Phenylpropionsäure mit NH_3 neutralisiert . . .	26	42	Dasselbe Blut wie in Versuch 42
46	2 g Zimtsäure mit NH_3 neutralisiert	23	37	
47	2 g Zimtsäure mit NH_3 neutralisiert	26	42	

zu denen Neubauer und Falta auf Grund ihrer Versuche gelangten.

Das Phenylalanin wird hiernach zunächst unter Desamidierung in Phenyl-α-Milchsäure, diese durch Eintritt zweier Phenolhydroxyle in der Stellung 2, 5 wahrscheinlich in Uroleucinsäure verwandelt, die dann durch Abspaltung von Kohlensäure und Aufnahme zweier Sauerstoffatome in Homogentisinsäure übergehen kann. Im Homogentisinsäurestadium setzt der Abbau am Benzolring an und führt zu seiner schließlichen Auflösung.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse beim Tyrosin; nur ist hier die Annahme einer Verschiebung oder Reduktion der ursprünglichen, in Parastellung befindlichen Hydroxylgruppe notwendig.

Hiernach ist also die Homogentisinsäure ein normales, intermediäres Stoffwechselprodukt, und im Homogentisinsäurestadium setzt der eigentliche Abbau des aromatischen Kerns ein.

Die Tatsache, daß jene von uns untersuchten Substanzen, deren aromatischer Kern im Tierkörper verbrennlich ist, in der isolierten Leber Aceton bilden, die Körper mit unverbrennlichem Kern aber nicht, mußte uns zu der Vermutung führen, daß das nach Zusatz von Tyrosin, Phenylalanin und Phenyl-α-Milchsäure entstandene Aceton als ein Spaltungsprodukt des aromatischen Kerns aufzufassen sei. Diese Vermutung war an der Hand der von Neubauer und Falta gewonnenen Vorstellungen einer experimentellen Prüfung zugänglich.

Wenn der Abbau der genannten aromatischen Aminosäuren unter intermediärer Bildung von Homogentisinsäure erfolgte, so mußte, die Richtigkeit der eben ausgesprochenen Vermutung vorausgesetzt, auch die Homogentisinsäure in der künstlich durchbluteten Leber Aceton bilden.

Dies ist nun in der Tat der Fall, wie aus den Versuchen 48 und 50 der Tabelle XIV hervorgeht[1]).

In Versuch 48 wurden dem Durchblutungsblut 2 g Homogentisinsäure, die mit Natronlauge neutralisiert war, auf einmal zugefügt. Es trat ein sehr starkes Stromhindernis ein, das nur durch äußerst hohen Druck überwunden werden konnte. Wohl darauf ist es zurückzuführen, daß die Acetonbildung in diesem Versuche wesentlich geringer ist als in den beiden folgenden.

In Versuch 49 wurde das Dibenzalaceton (wieder aus dem Destillat von 3000 g Filtrat) dargestellt; die Ausbeute betrug annähernd 0,06 g, also das Dreifache der nach Durchströmung mit normalem Blut erhaltenen.

Dieselben aromatischen Substanzen also, welche im normalen Organismus total verbrennlich sind, dieselben Substanzen, welche bei der Alkaptonurie in Homogentisinsäure übergehen — und auch die Homogentisinsäure selbst[2]) — bilden in der isolierten Leber

[1]) Für die gütige Überlassung einer größeren Menge von homogentisinsaurem Blei, aus dem wir die zu den Versuchen 48 bis 50 benutzte Homogentisinsäure darstellten, sind wir Herrn O. Schumm, Vorstand des chem. Laboratoriums im Allgemeinen Krankenhause zu Hamburg-Eppendorf, zu besonderem Danke verpflichtet.

[2]) Die Verbrennlichkeit der Homogentisinsäure war für den Organismus des Hundes bereits von Baumann und Wolkow (a. a. O., S. 283 ff.) wahrscheinlich gemacht worden, für den menschlichen wurde sie durch Heinrich Embden (a. a. O., S. 328 ff.) erwiesen.

Tabelle XIV.

1	2	3	4	5
Nr.	Dem Durchblutungsblut zugefügte Substanz	Gebildete Menge Aceton pro Liter mg	Im ganzen gebildete Menge Aceton mg	Bemerkungen
48	2 g Homogentisinsäure mit Natronlauge neutralisiert	39	62	Starkes Stromhindernis, das nur durch sehr hohen Druck überwunden werden konnte.
49	2 g Homogentisinsäure mit NH_3 neutralisiert	68	109	
50	2 g Homogentisinsäure mit NH_3 neutralisiert	51	82	

Aceton, während jene Substanzen, deren Ring für den Tierkörper unangreifbar ist, kein Aceton bilden.

Nach diesen Versuchsergebnissen kann es keinem Zweifel unterliegen, daß das in unseren Versuchen mit Tyrosin, Phenylalanin, Phenyl-α-Milchsäure und Homogentisinsäure gebildete Aceton dem aromatischen Kern dieser Substanzen entstammte.

Hiermit erfahren wir zum ersten Male etwas über die beim Abbau des Benzolringes im Organismus intermediär sich abspielenden Prozesse.

In welcher Weise die Acetonbildung aus dem Benzolring erfolgt, darüber lassen sich fest begründete Vorstellungen unseres Erachtens im Augenblick nicht gewinnen.

Wir möchten nur auf eine von den zahlreichen von vornherein vorhandenen Möglichkeiten hinweisen, und auch auf diese nur, weil sie uns zu einem weiteren Versuche veranlaßte.

Es lag nämlich nahe, die von Knoop an aromatischen, von uns an aliphatischen Fettsäuren gewonnenen Erfahrungen auch auf die Homogentisinsäure zu übertragen.

Betrachten wir die Formel dieser Substanz:

```
        COH
   HC //  \ CH
     |      
   HC \   // CCH2COOH
        COH
```

so würde eine in β-Stellung zum Carboxyl der Seitenkette einsetzende Oxydation das C-Atom am Kern treffen. Unter Abspaltung der Seitenkette und Oxydation des eben genannten C-Atoms zum Carboxyl würde dann der Ring gesprengt werden können.

Wir möchten uns auf eine weitere Verfolgung dieses einstweilen rein hypothetischen Gedankens hier nicht einlassen, sondern nur erwähnen, daß wir, von ihm ausgehend, einen Versuch mit 1, 2, 4-Trioxybenzol (Oxyhydrochinon) anstellten. (Versuch 51.) Der Versuch, bei dem 0,5 g der Substanz zur Anwendung kamen, fiel vollkommen negativ aus (Acetonbildung pro Liter Blut 14 mg), aber die in Methämoglobinbildung sich äußernde Giftwirkung auf das Blut war eine so erhebliche, daß wir ihm irgend welche Beweiskraft nicht zuerkennen möchten.

Aus der vorliegenden Untersuchung ergibt sich, daß sehr verschiedenartige Substanzen in der isolierten Leber Aceton bilden und daß dementsprechend auch der Chemismus dieser Acetonbildung ein sehr verschiedenartiger sein kann.

1. Von aliphatischen Aminosäuren lieferte das Leucin Aceton im Gegensatz zu allen übrigen untersuchten Substanzen dieser Gruppe, insbesondere auch zur Aminoisovaleriansäure.

2. Von drei untersuchten Fettsäuren mit verzweigter Kette erwies sich die dem Leucin entsprechende Isobutylessigsäure ebenso wie die Isobuttersäure nicht als Acetonbildner, während die der Aminovaleriansäure entsprechende Isovaleriansäure die Acetonbildung in der Leber mächtig steigerte.

3. Von den Homologen der Essigsäurereihe wurde bisher nur die Buttersäure untersucht; sie bildete ebenso wie die augenscheinlich aus ihr intermediär entstehende β-Oxybuttersäure sehr erhebliche Acetonmengen.

4. Schließlich zeigte sich, daß sämtliche untersuchten aromatischen Substanzen, deren Benzolring im Tierkörper zerstörbar ist (Tyrosin, Phenylalanin, Phenyl-α-Milchsäure, Homogentisinsäure), Aceton bilden, während bei einer Reihe von Körpern mit unverbrennlichem aromatischem Kern (Phenylessigsäure, Phenylpropionsäure, Zimtsäure, Phenyl-β-Milchsäure) eine Acetonbildung nicht erfolgte.

Die auf Grund dieser Versuchsergebnisse, sowie auf Grund der Resultate früherer Forschungen gewonnenen Vorstellungen können hier nicht nochmals ausführlich begründet werden, doch seien einige von ihnen kurz erwähnt:

1. Der Abbau der aliphatischen Monaminomonocarbonsäuren geschieht in der Art, daß sie unter Kohlensäureabspaltung und Desamidierung in Substanzen mit einem Kohlenstoffatom weniger übergehen, wahrscheinlich in die entsprechenden Fettsäuren.

2. Nach der Umwandlung in Fettsäuren werden sie ebenso wie diese selbst weiter verarbeitet, d. h. sie werden unter Oxydation am β-Kohlenstoffatom abgebaut.

Diese Gesetzmäßigkeit gilt sowohl für Fettsäuren mit verzweigter wie allem Anscheine nach auch für solche mit gerader Kette.

3. Unsere Untersuchungen an aromatischen Substanzen erscheinen geeignet, die von Neubauer und Falta bezüglich des Abbaues der aromatischen Aminosäuren geäußerten Vorstellungen wesentlich zu stützen. Dieselben Substanzen, deren Benzolring im Organismus des Normalen verbrennlich ist, bilden bei der Akaptonurie Homogentisinsäure und bei der künstlichen Zirkulation der Leber Aceton. Das letztere ist hier als ein Spaltungsprodukt des aromatischen Kerns aufzufassen.

Neben den eben rekapitulierten ergaben sich einige weitere, einstweilen weniger fest begründete Anschauungen. Von diesen sei hier die Vorstellung nochmals erwähnt, daß beim Abbau des Fettes sowohl wie bei dem der aus Eiweißkörpern entstandenen Aminosäuren und dem der aus Kohlenhydrat entstandenen Milchsäure Substanzen mit einer zweiatomigen Kohlenstoffkette gebildet werden, welchen bei den verschiedensten Aufbauvorgängen, insbesondere auch bei der Synthese des Traubenzuckers, eine wichtige Rolle zufallen dürfte.

X.

Abbau des Histidins.

Von **Sigmund Fränkel**, Wien.

Aus dem Laboratorium der Spiegler-Stiftung in Wien[1]).

In meiner Abhandlung über Darstellung und Konstitution des Histidins[2]) habe ich zeigen können, daß das Histidin, über dessen Konstitution damals keine Untersuchungen vorlagen, und das als Diaminosäure aufgefaßt wurde, eine primäre Aminogruppe, eine Carboxylgruppe und einen Diazinring enthält. Diesen Diazinring habe ich als einen hydrierten Pyrimidinring aufgefaßt, da Histidin die Weidelsche Reaktion gibt. H. Pauly[3]) hat dann durch Darstellung des Methylesters die Anwesenheit der Carboxylgruppe bestätigt, ebenso der Aminogruppe durch Einwirkung von Naphtalinsulfochlorid, hingegen neigt er aus theoretischen Gründen der Ansicht zu, daß der im Histidin enthaltene Diazinring ein Imidazolring sei. Charakteristisch für Imidazol (und daher auch für Histidin) ist nach Pauly die Reaktion mit Diazobenzolsulfosäure. Versetzt man eine mit Soda alkalisch gemachte Lösung von Histidin mit Diazobenzolsulfosäure, so erhält man einen Farbstoff, der in saurer Lösung rein orange, in alkalischer dunkel kirschrot gefärbt ist. Dies ist der einzige experimentelle Beweis, den Pauly für die Imidazolnatur des Histidins beibringt. Doch warnt Pauly selbst davor, diese Reaktion etwa allgemein zur Unterscheidung des Imidazolringes vom Pyrimidinring zu verwerten; er vermutet, daß sie nur bei sauerstoffreichen Systemen auftritt, denn sauerstoffhaltige Pyrimidine treten mit Diazoniumsalzen jedenfalls zu Farbstoffen zusammen. Diese Reaktion ist nun in der Tat keine

---

[1]) Die Untersuchung wurde zum Teil noch im physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg ausgeführt.

[2]) Monatsh. f. Chemie 24, 229.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 42, 508.

genügende Stütze für die Annahme eines Glyoxalinringes im Histidin, denn auch Pyrimidinderivate, die keinen Sauerstoff im Ring tragen, wie die Pyrimidincarbonsäure, geben nach meinen Untersuchungen in gleicher Weise die Färbung mit Diazobenzolsulfosäure in von Soda alkalisch reagierender Lösung.

Die Annahme Paulys, daß im Histidin ein Imidazolring enthalten sei, haben Knoop und Windaus[1]) experimentell geprüft, indem sie aus dem von mir dargestellten Oxydesaminohistidin mittels Jodwasserstoff die hydroxylfreie Verbindung darstellten und diese von ihnen als Imidazolpropionsäure aufgefaßte Substanz mit synthetischer Imidazolpropionsäure verglichen und identisch fanden.

Meine experimentellen Untersuchungen haben andere Bahnen eingeschlagen, und wenn ich die Resultate hier mitteile, hoffe ich zur Klärung der Histidinfrage noch beitragen zu können.

Es ist weder von Pauly noch von Knoop und Windaus berücksichtigt worden, daß Imidazolderivate bei Behandlung mit Benzoylchlorid und Lauge unter Abspaltung von Ameisensäure und Aufspaltung des Imidazolringes in Dibenzoyldiaminoäthylenderivate übergehen, wie es Bamberger und Berlé[2]) gezeigt haben, eine Angabe, die dann von Pinner[3]) gelegentlich seiner Untersuchungen über Pilokarpin bestätigt wurde. Pinner konnte noch zeigen, daß die Aufspaltung des Imidazolringes durch Benzoylchlorid und Lauge abhängig ist von dem Imidwasserstoffe im Ringsystem. Ist dieser Wasserstoff (etwa durch ein Methylradikal wie im Pilokarpin) ersetzt, so erfolgt die Spaltung nicht. Nun ist der Imidwasserstoff im Histidin reaktionsfähig, kann durch Silber ersetzt werden, wie die Darstellung des Silbersalzes beweist, und durch das Radikal der Naphtalinsulfosäure, wie die Reaktion mit Naphtalinsulfochlorid zeigt, die Pauly ausgeführt hat. Ist nun Histidin ein Imidazolderivat, so wäre, analog den anderen bekannten Imidazolderivaten, bei der Reaktion mit Benzoylchlorid und Lauge unter Abspaltung von Ameisensäure eine Ringsprengung und Bildung eines Tribenzoylderivates zu erwarten (da eine Benzoylgruppe überdies in die primäre präformierte Aminogruppe eintreten muß).

Aber schon die Beobachtung von Pauly, daß bei der Behandlung von Histidin mit Naphtalinsulfochlorid und Lauge ein

---

[1]) Diese Beiträge 7, 142.

[2]) Berl. Ber. 1892, 25, 278.

[3]) Pinner und Kohlhammer, Berl. Ber. 33 2357; Pinner und Schwarz, ebenda 35, 192, 2441.

Dinaphtalinsulfosäurehistidin entsteht, sprach nicht dafür, daß die im wesentlichen analoge Reaktion mit Benzoylchlorid und Lauge beim Histidin zu einer Ringsprengung führen werde, eine Ringsprengung, welche bis nun die einzig bekannte wirklich charakteristische Reaktion des Imidazolringes ist.

Meine Untersuchungen zeigten, daß bei Behandlung mit Benzoylchlorid und Lauge nach Schotten und Baumann sich keine Verbindung abscheidet, aber in der Reaktionsflüssigkeit Monobenzoylhistidin enthalten ist, daß also trotz Verwendung eines großen Benzoylchloridüberschusses eine Ringsprengung, wie sie bei Imidazolderivaten erwartet werden müßte, nicht stattfindet.

Der Abbau des Histidins unter Eliminierung der primären Aminogruppe auf anderem Wege, als auf dem von Knoop und Windaus eingeschlagenen, führte zu einer Substanz, die im Schmelzpunkte von der Imidazolpropionsäure differiert.

Ferner spricht gegen die Imidazolnatur des Histidins noch der Umstand, daß die Silberverbindungen der Pyrimidine in Ammoniak löslich sind; die Imidazole geben flockige Niederschläge mit Silber, die selbst in einem erheblichen Ammoniaküberschuß nur sehr wenig löslich sind[1]), während Histidinsilber in Ammoniak löslich ist.

Sowohl die Barytspaltung des Histidins als die pyrogene Spaltung führte zu einer Verbindung von der Formel $C_4H_6N_2O_2$, die einen Imidwasserstoff enthält und sonst Säurecharakter zeigt.

Bei der Oxydation mit rauchender Salpetersäure wurde eine Substanz erhalten, die das salpetersaure Salz derselben Verbindung $C_4H_6N_2O_2$ zu sein scheint.

Für den Umstand, daß Histidin eine α-Aminosäure ist, spricht die Beobachtung, daß es süßen Geschmack zeigt.

Die Versuche, Histidin mit Zinn und Salzsäure zu reduzieren, führten stets wieder zum Histidindichlorid. Das Histidin erwies sich selbst bei gelinder Kalischmelze als beständig.

Die Oxydation des Histidins mit Schwefelsäure und Bichromat ergab Essigsäure und Blausäure.

Experimenteller Teil.

Jochemsche Reaktion mit Histidin. Chlorhistincarbonsäure. 5 g feingepulvertes Histidinchlorhydrat wurden in 50 g rauchender Salzsäure verteilt; dazu wurden unter Eiskühlung und stetem Rühren 5 g Natriumnitrit in konzentrierter wässeriger Lösung

[1]) Burian, Berl. Ber. 37, 696.

tropfenweise zugefügt. Die Lösung blieb mehrere Stunden bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde Luft durchgeblasen und die nun fast farblose Flüssigkeit über Glaswolle vom Kochsalz abfiltriert, zur Trockne verdampft, mit Alkohol von 95 Proz. aufgenommen, vom auskristallisierenden Kochsalz getrennt und eingeengt. Der restierende Sirup war nicht zur Kristallisation zu bringen, er löste sich in jedem Verhältnis in Alkohol und Wasser, war unlöslich in Äther, löslich in Eisessig.

Der in Eisessig gelöste Sirup wurde mit Zinkstaub reduziert, die abfiltrierte Flüssigkeit mittels Schwefelwasserstoff von Zink befreit, mit Silberacetat versetzt, filtriert, wiederum mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert und zur Kristallisation eingeengt; die Kristalle aus Wasser umkristallisiert. Centimetergroße wasserklare Tafeln F. 80°.

Bei 120° getrocknet verlieren:

0,2897 g Substanz 0,0313 g H_2O, d. i. 10,8 Proz. H_2O.

Berechnet für 1 Mol. H_2O 9,4 Proz.

Nach dem Trocknen bei 120° gaben 0,1671 g:

23,18 ccm N bei 19,4° und 759 mm Druck oder 15,90 Proz. N.

0,1708 g gaben:

0,2601 g CO_2 und 0,0633 H_2O oder 41,22 Proz. C und 4,12 Proz. H.

Berechnet für $C_6H_7N_2O_2Cl$: C 41,25 Proz., H 4,01 Proz., N 16,04 Proz.

Histincarbonsäure. Die Chlorhistincarbonsäure wird anhaltend unter Durchleiten von Kohlensäure mit Zinkstaub gekocht. Es wird filtriert, der Zinkstaub und ebenso die Lösung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Es kristallisiert im Vakuum die Histincarbonsäure. Schmelzpunkt 195°. Die Schmelze erstarrt kristallinisch. Kreideweiße kleine Kristalle. Löslich in Wasser mit stark saurer Reaktion, ohne Kristallwasser kristallisierend.

0,1621 g bei 115° C getrocknet gaben:

0,3082 g CO_2 und 0,0841 g H_2O, entsprechend 51,85 Proz. C und 5,73 Proz. H.

0,1441 g gaben:

24,39 ccm N bei 17,7° und 770 mm Druck, entsprechend 19,74 Proz. N.

Berechnet für $C_6H_8N_2O_2$: C 51,43 Proz., N 20,05, H 5,7 Proz.

Oxydation des Histidins mit Bichromat und Schwefelsäure. Bei der Oxydation von Histidin mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure unter gleichzeitiger Destillation konnte Blausäure und Essigsäure nachgewiesen werden.

0,5553 g des Barytsalzes (aus dem Destillate gewonnen) gaben:

0,0427 g H_2O oder 7,69 Proz. H_2O.

Berechnet für $C_4H_6O_4Ba + H_2O$: 7,58 Proz. H_2O.

0,1234 g gaben:

0,1124 g $Ba SO_4$ oder 53,61 Proz. Ba.

Berechnet für essigsaures Baryum 53,79 Proz. Ba.

Das Barytsalz gab die Eisenchloridprobe.

Die Blausäure wurde durch die Berlinerblaureaktion nachgewiesen.

Racemisches Histidin. Histidin racemisiert wie die anderen Aminosäuren bei Behandlung mit 20 proz. Salzsäure im Schießrohr bei 160°. Das Reaktionsprodukt, racemisches Histidindichlorid, schmilzt bei 220° C.

Benzoylierung des Histidins. Histidinchlorhydrat wurde in üblicher Weise nach Schotten-Baumann behandelt und hierbei ein großer Überschuß von Benzoylchlorid über die für das Tribenzoat berechnete Menge verwendet. Es schied sich keine feste Substanz ab. Die Lösung wurde hierauf mit Salzsäure stark angesäuert und von der abgeschiedenen Benzoesäure abfiltriert, das Filtrat mit Äther extrahiert. Weder die Benzoesäure der Fällung noch die aus dem Ätherextrakt enthielt stickstoffhaltige Substanz. Hierauf wurde mit Natronlauge das Filtrat neutralisiert und mit Sublimat und Soda gefällt, die Fällung gut ausgewaschen und bei Verwendung von viel Wasser als Suspensionsflüssigkeit mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Es wird vom Schwefelquecksilber abfiltriert, Luft durchgeblasen und eingeengt. Es kristallisiert alsbald in großen wasserhellen Kristallen:

Monobenzoylhistidin $C_6H_5 . CO . C_6H_8N_3O_2 + H_2O$.

Schmelzpunkt 230° unter Zersetzung.

Unlöslich in Wasser und organischen Solventien, leicht löslich in Alkalien.

0,1560 g bei 110° getrocknet gaben:

0,3426 g CO_2 entsprechend 56,7 Proz. C.
0,0761 g H_2O „ 5,45 „ H.

0,1428 g gaben:

19 ccm N bei 22,3° und 766 mm Druck, entsprechend 15,2 Proz. N.

Berechnet: 56,31 Proz. C, 5,41 Proz. H, 15,16 Proz. N.

Benzoylierung der Histincarbonsäure. Nach dem gleichen Verfahren wurde die Histincarbonsäure benzoyliert und wieder abgeschieden. Es wurde die unveränderte Histincarbonsäure wiedergewonnen.

0,1144 g Substanz gaben (aschefrei gerechnet):

20,18 ccm N bei 22,4° und 759 mm Druck, entsprechend 19,99 Proz. N.

Berechnet für Histincarbonsäure: 20,05 Proz. N.

Pyrogene Spaltung. Sie erfolgt beim Erhitzen des Histidinchlorhydrats über dem Schmelzpunkte, verläuft unter CO_2-Entwickelung sehr ungleichmäßig, und es gelingt nur schwierig, annähernd analysenreine Substanz zu erhalten.

Bei der fraktionierten Kristallisation gelang es, eine kleine, eben zur Elementaranalyse ausreichende Menge Substanz zu gewinnen, die in Tafeln kristallisierte:

0,1426 g im Vakuum über SO_4H_2 getrocknet gaben:

29,04 ccm N bei 21,5° und 768 mm Druck, entsprechend 23,53 Proz. N.

0,1571 g gaben:

0,2433 g CO_2 und 0,0701 g H_2O, entsprechend 42,2 Proz. C und 4,97 Proz. H.

Eine Substanz $C_4N_2H_6O_2$ verlangt 42,11 Proz. C, 5,26 Proz. H und 24,56 Proz. N.

Einwirkung von rauchender Salpetersäure auf Histidin. Bei starkem Erhitzen mit rauchender Salpetersäure erhielt ich eine kleine Menge einer gelben kristallisierten Substanz, deren Elementaranalyse folgende Zahlen ergab.

0,1819 g der bei 110° getrockneten Substanz gaben:

0,1855 g CO_2 und 0,0669 g H_2O, entsprechend 27,81 Proz. C, 4,08 Proz. H.

0,1671 g der bei 110° getrockneten Substanz gaben:

34,81 ccm N bei 20,2° und 755 mm Druck, entsprechend 23,67 Proz. N.

Für $C_4N_3H_7O_5$ berechnet: 27,11 Proz. C, 3,95 Proz. H, 23,72 Proz. N.

Die Kristallwasserbestimmung ergab 6,8 Proz. Kristallwasser.

Barytspaltung des Histidins. Histidin wurde im Autoklaven bei 40 Atmosphären und mit der zehnfachen Menge Ätzbaryt und wenig Wasser durch drei Stunden (in einem beiderseits verschraubten Stahlrohr) erhitzt. Die erhaltene Flüssigkeit wurde destilliert, so lange noch das Destillat alkalisch reagierte. Das Destillat gab mit Platinchlorid ein in Wasser leicht lösliches Platinat, das zur Analyse nicht ausreichte. Der Kolbenrückstand wurde mit Kohlensäure in der Wärme behandelt zur Entfernung des Baryts. Ein Teil des Filtrats wurde mit Schwefelsäure angesäuert und destilliert. Das saure Destillat wurde mit Barytwasser neutralisiert und nach Entfernung des Barytüberschusses mittels Kohlensäure das Baryumsalz durch Eindampfen gewonnen. Das Salz erwies sich als frei von Kristallwasser und als ameisensaures Baryum.

0,3325 g gaben:

0,3407 g $BaSO_4$, entsprechend 60,4 Proz. Ba.

Für ameisensaures Baryum berechnet: 60,33 Proz. Ba.

Die Substanz reduziert sehr stark salpetersaures Silber, ist in Alkohol unlöslich, in Wasser löslich und gibt den charakteristischen

Arrakgeruch beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure und Alkohol.

Der Hauptteil des Filtrats wurde von Chlorbaryum befreit und fraktioniert kristallisiert. Es kristallisierte die Verbindung

$$C_4H_6N_2O_2 + 2\,H_2O.$$

Im Kristallwasser schmelzend. Nach Entfernung des Kristallwassers ist der Schmelzpunkt 247°. Beim Erhitzen auf 115° färbt sich die Substanz grau, ballt sich zusammen. Sie verliert beim Trocknen bei 115° 15,75 Proz. Kristallwasser.

Die Elementaranalyse der vakuumtrockenen Substanz ergab (auf aschefreie Substanz gerechnet, da die Substanz 1 Proz. Asche enthielt):

0,1828 g gaben:

CO_2 = 0,2190 g, entsprechend 32,62 Proz. C.
H_2O = 0,1047 g, „ 6,36 „ H.

Die N-Bestimmung nach Dumas ergab:

0,1676 g gaben:

26,9 ccm N bei 21° T. und 758 mm B., entsprechend 18,18 Proz. N.

Berechnet für $C_4H_6N_2O_2 + 2\,H_2O$: 32,00 Proz. C, 6,66 Proz. H, 18,66 Proz. N.

Die Substanz gibt die Weidelsche Reaktion nicht.

Die Substanz wurde mit Benzoylchlorid und Lauge nach Schotten-Baumann behandelt Es entstand kein Niederschlag. Der Versuch wurde nach dem gleichen Verfahren, wie es bei der Isolierung des Benzoylhistidins angewandt wurde, aufgearbeitet.

Aus siedendem Wasser umkristallisiert, erhält man einige Millimeter große rhomboide wasserhelle Kristalle. Schmelzpunkt 225°. Sehr schwer löslich in kaltem, leicht in siedendem Wasser. Die Lösung reagiert stark sauer.

0,1938 g bei 115° getrockneter Substanz gaben:

0,3967 g CO_2 und 0,0893 g H_2O oder 55,83 Proz. C und 5,11 Proz. H.

Berechnet für $C_6H_5 . CO . C_4H_5N_2O_2 + H_2O = C_{11}H_{12}N_2O_4$: 55,93 Proz. C, 5,08 Proz. H.

Für eine Stickstoffbestimmung fehlte es an Substanz.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter
Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben
von

Franz Hofmeister
o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

VIII. Band 5. bis 7. Heft
(Ausgegeben Juni 1906)

Braunschweig
Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn
1906

Inhalt des 5. bis 7. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie" erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge" soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen" kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

XI.

Über kristallinische Chitosanverbindungen aus Sepienschulpen.

Ein Beitrag zur Kenntnis des Chitins.

Von Privatdozent Dr. **Otto von Fürth,**
Assistent am k. k. physiologischen Institute der Universität zu Wien,
und Dr. **Michele Russo.**

1.

Die vorliegende Untersuchung wurde von einem zweifachen Gesichtspunkte aus in Angriff genommen: durch ein eingehendes Studium eines nur ungenügend bekannten Abbauproduktes des Chitins, des Chitosans, hofften wir einerseits einen Beitrag zur Aufklärung der Konstitution dieser merkwürdigen Substanz liefern zu können; andererseits erwarteten wir auf diesem Wege einen Aufschluß über die vom vergleichend-physiologischen Standpunkte nicht unwichtige Frage, ob die Chitine verschiedener Tierkreise miteinander identisch seien, oder ob das Chitin nur als Sammelbegriff für eine bestimmte Klasse von Stützsubstanzen zu gelten habe.

Rouget[1]) beobachtete bereits im Jahre 1859, daß beim Erhitzen von Chitin mit Ätzkali eine gelatinöse Substanz entsteht, die mit Jod eine violette Färbung gibt und, im Gegensatze zum Chitin, in verdünnten Säuren sehr leicht löslich ist. Dieses Abbauprodukt des Chitins wurde von Ch. Fischer[2]) und Araki[3]) unter der Leitung Hoppe-Seylers einer genaueren Untersuchung unterzogen und mit dem Namen „Chitosan“ belegt.

---

[1]) Rouget, Des substances amylacées dans les tissus des animaux, spécialement des articulés (Chitine). Compt. rend. 48, 792—795 (1859).

[2]) F. Hoppe-Seyler, Über Chitin und Cellulose, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 27, 3329 bis 3331 (1894); vgl. auch ebenda 28, 82 (1895).

[3]) T. Araki, Über das Chitosan. Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 498.

Das Chitin wurde mit Ätzkali auf dem Ölbade auf 180° erhitzt, die mit Wasser ausgewaschene Masse durch Lösen in Essigsäure und Fällen mit Natronlauge gereinigt, bei 115 bis 120° getrocknet und der Analyse unterzogen. Diese ergab für C 43,58 bis 44,09 Proz., H 6,54 bis 6,76 Proz., N 7,43 bis 7,68 Proz., woraus Araki $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$ als Formel des Chitosans berechnete.

Bei der Umwandlung des Chitins, dem Araki die Formel $C_{18}H_{30}N_2O_{12}$ zuschrieb, in Chitosan tritt Essigsäure auf; da nun bei der Spaltung des Chitosans mit konzentrierter Salzsäure neben Glykosamin wiederum Essigsäure zum Vorschein kam, nahm Araki an, daß sich der Abbau des Chitins auf dem Umwege über das Chitosan in folgender Weise vollziehe:

$$\underset{\text{Chitin}}{C_{18}H_{30}N_2O_{12}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Chitosan}}{C_{14}H_{26}N_2O_{10}} + \underset{\text{Essigsäure}}{2\,CH_3.COOH}$$

$$\underset{\text{Chitosan}}{C_{14}H_{26}N_2O_{10}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Glykosamin}}{2\,C_6H_{13}NO_5} + \underset{\text{Essigsäure.}}{CH_3.COOH}$$

In der Annahme, daß das Chitin ein acetyliertes Chitosan sei, wurde Araki durch die Beobachtung bestärkt, daß er, ebenso wie auch Ch. Fischer, durch Erhitzen von Chitosan mit Essigsäureanhydrid im Rohre auf 135° sehr schwer lösliche Additionsprodukte erhielt, die, ohne mit dem Chitin identisch zu sein[1]), in ihrem Verhalten gegen Reagenzien keinen Unterschied dem Chitin gegenüber erkennen ließen.

Daß sich aber der Abbau des Chitins keineswegs in der durch Arakis Formeln angedeuteten einfachen Weise vollzieht, ergibt sich aus den Untersuchungen von Sigmund Fränkel und A. Kelly[2]), die bei der Chitinspaltung Acetylchitosamin und Acetyldichitosamin fanden und zur Schlußfolgerung gelangten, „daß das Chitin und Chitosan keineswegs die angenommene einfache Zusammensetzung besitzen, sondern vielmehr höher zusammengesetzte, stickstoffhaltige, am N acetylierte, bzw. mit Acetylessigsäure verbundene Polysaccharide sind, deren Analogie mit Stärke und Glykogen sich auch in der Jodreaktion kundgibt, welche den tieferen Spaltungsprodukten, den Monosen und Biosen, fehlt".

[1]) Aus der Analyse der Additionsprodukte folgerte Araki, daß das Chitosan mindestens drei Acetylgruppen aufgenommen habe, während das Chitin gemäß der ihm zugeschriebenen Formel nur zwei Acetylkomplexe enthalten durfte.

[2]) Sigmund Fränkel und Agnes Kelly, Beiträge zur Konstitution des Chitins. Sitzungsber. der Kaiserl. Akad. der Wissensch. in Wien, mathem.-naturw. Klasse, Bd. 110, Abt. II b, Dezember 1901.

Dem Chitosan sehr ähnliche Produkte haben E. Winterstein[1]) sowie E. Gilson[2]) durch Kalischmelze aus gewissen Pilzen erhalten und daraus auf die Gegenwart eines mit Chitin identischen oder demselben doch sehr nahestehenden Körpers geschlossen. Die von Gilson ausgeführten Analysen seines „Mykosins" (im Mittel C 43,74 Proz., H 7,30 Proz., N 7,31 Proz.) stimmen annähernd mit den Chitosanwerten überein.

Gilson erwähnt, daß sein Mykosin eine kristallisierte, salzsaure Verbindung liefert. Ebenso findet sich bei Hoppe-Seyler[3]) folgende kurze Bemerkung: „Das Umwandlungsprodukt des Chitins ..., dem ich den Namen Chitosan gegeben habe, zeigt insofern basische Eigenschaften, als es sich mit Säuren leicht verbindet, beim Verdunsten der wässerigen Lösung der salzsauren Verbindung diese in quadratischen Kristallen liefert, die sich leicht in Wasser lösen; diese Lösung wird vom Überschuß von Salzsäure gefällt."

Offenbar ist aber Hoppe-Seyler später zur Annahme gelangt, daß die Kristalle, die er seinerzeit in Händen gehabt hatte, nicht salzsaures Chitosan, sondern nichts anderes als salzsaures Glykosamin gewesen seien. Wenigstens findet in der wenig später unter Hoppe-Seylers Leitung ausgeführten Untersuchung Arakis das kristallisierte Chitosan-Chlorhydrat keine Erwähnung, und beziehen sich die zahlreichen mitgeteilten Analysen ausschließlich auf amorphe Produkte; ferner wird die vorerwähnte Beobachtung von Gilson in folgender Weise kritisiert: „Das von Gilson beschriebene Verhalten der Mykosine gegen verschiedene Reagenzien stimmt so gut mit den Reaktionen des Chitosans überein, daß das Mykosin als identisch mit dem Chitosan angenommen werden darf; die beschriebene kristallisierte, salzsaure Verbindung ist aber wohl die des Glykosamins und nicht des Chitosans."

Soviel über die das Chitosan betreffenden Literaturangaben, aus denen die Lückenhaftigkeit der Kenntnisse über diesen Gegenstand wohl zur Genüge hervorgeht.

Alles, was über das Chitosan, und nahezu alles, was über das Chitin bekannt ist, bezieht sich auf die Stützsubstanz des Arthropodenpanzers, während über das Chitin anderer Tierkreise nur höchst spärliche Daten vorliegen.

---

[1]) E. Winterstein, Über die Spaltungsprodukte der Pilzcellulose. Ber. der deutsch. chem. Ges. 28, 167; vgl. auch ebenda, S. 1372.

[2]) E. Gilson, Das Chitin und die Membranen der Pilzzellen, ebenda 28, 821; ferner: Recherches chimiques sur la membrane cellulaire des champignons. „La Cellule" 11, Fasc. 1 (zitiert nach Araki).

[3]) Hoppe-Seyler, l. c., S. 3329.

Von den eingangs angedeuteten vergleichend-physiologischen Gesichtspunkten aus haben wir nun das Chitin der Mollusken zum Gegenstande unserer Untersuchungen gewählt. Dasselbe ist, insoweit es den organischen Hauptbestandteil der Rückenschulpe der Kephalopoden bildet, unschwer in ausreichenden Quantitäten zugänglich und vermöge seiner eigentümlichen Beschaffenheit für die Gewinnung reinen Chitins besonders geeignet.

Das Vorkommen einer chitinartigen Substanz in der Rückenschulpe der Kephalopoden wurde, wie es scheint, von Froriep[1]) entdeckt. Krukenberg[2]) analysierte aus den Schulpen des Tintenfisches (Sepia) und des Kalmars (Loligo) dargestellte Präparate und fand sie ähnlich zusammengesetzt (C 46,14 bis 46,57 Proz., H 6,39 bis 6,53 Proz., N 6,81 bis 7,35 Proz.) wie das Arthropoden-Chitin. Durch Säurespaltung erhielt er daraus etwa 85 Proz. Glykosamin. Ambronn[3]) glaubte durch Extraktion mit Kupferoxydammoniak Cellulose aus Sepienschulpen erhalten zu haben; diese bereits von Krawkow[4]) und Zander[5]) bezweifelte Angabe wurde von F. N. Schulz[6]) widerlegt und auf eine Verwechselung von Eiweißstoffen mit Cellulose zurückgeführt.

Da die vorliegenden dürftigen Daten keinerlei Andeutung über den schrittweisen Abbau des Molluskenchitins enthielten und nur von einem solchen ein tieferer Einblick in die chemische Eigenart dieser Substanz zu erwarten war, betrachteten wir es zunächst als unsere Aufgabe, festzustellen, ob sich aus dem Chitin der Kephalopodenschulpe eine chitosanartige Substanz gewinnen lasse, und ob demnach der schrittweise Abbau hier zu demselben Produkte führe, wie bei dem Chitin des Arthropodenpanzers.

2. Darstellungsverfahren.

Ausgangsmaterial. Das Material für unsere Versuche bildeten Sepienschulpen. Diese kommen vollkommen rein präpariert

---

[1]) Froriep, Bindesubstanz bei wirbellosen Tieren. Pflügers Arch. f. Physiol. 5, 320 (1872).

[2]) Krukenberg, Über das Conchiolin und das Vorkommen von Chitin bei Kephalopoden. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 18, 989 bis 993 (1885).

[3]) Ambronn, Cellulosereaktion bei Arthropoden und Mollusken. Mitteilungen der zoologischen Station Neapel 9, 475 bis 478 (1890).

[4]) Krawkow, Über verschiedene Chitine. Zeitschr. f. Biol. 29, N. F., 177 (1892).

[5]) Zander, Vergleichende und kritische Untersuchungen zum Verständnis der Jodreaktion des Chitins. Pflügers Arch. f. Physiol. 66, 545 (1897).

[6]) F. N. Schulz, Kommt in der Sepiaschulpe Cellulose vor? Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 124 (1900).

und getrocknet in den Handel (sie dienen zur Bereitung von Zahnpulver). Herr Professor Dr. Karl Cori, Direktor der k. k. zoologischen Station in Triest, hatte die besondere Freundlichkeit, uns größere Mengen von diesem Material zu verschaffen. Etwa 200 g bereits getrockneter und entkalkter Sepienschulpen verdanken wir der Liebenswürdigkeit des Herrn Prof. Dr. Wetzel in Breslau.

Die Sepienschulpen wurden mit reiner, verdünnter Salzsäure entkalkt. Es empfiehlt sich im Interesse der Ausbeute, die Anwendung von konzentrierter, sowie auch von roher Salzsäure zu vermeiden und die spröden Schulpen nicht etwa fein zu pulverisieren, sondern nur zu nußgroßen Stücken zu zerstoßen. Nach Beseitigung der Kalksalze bleibt dann die organische Grundsubstanz in Form lockerer Lamellen zurück und kann leicht durch Auswaschen auf einem Siebe von anhaftenden löslichen Bestandteilen befreit werden. Zum Zwecke der Beseitigung der reichlich vorhandenen Eiweißkörper wurden die Lamellen sodann einige Stunden lang mit 20proz. Kalilauge gekocht und wiederum ausgewaschen.

Nach diesem Vorgange erschienen die Chitinlamellen bräunlich gefärbt. Wir gingen nun zuweilen, um rein weißes Chitin zu erhalten, derart vor, daß wir die Lamellen mit einer Permanganatlösung behandelten. Dabei nehmen die Lamellen durch Einlagerung von Mangansuperoxyd erst eine braune Färbung an, werden jedoch, wenn man sie in Wasser suspendiert und dieses mit eingeleiteter schwefliger Säure sättigt, nach einiger Zeit ganz farblos. Da es sich aber herausstellte, daß auch rein weißes Chitin bei der Chitosandarstellung in der Kalischmelze sich neuerlich verfärbt und eine Wiederholung des Entfärbungsvorganges erfordert, wurde bei den späteren Versuchen meist von dieser Prozedur Abstand genommen.

Überführung des Chitins in Chitosan. Nach zahlreichen Versuchen ergab sich uns zur Gewinnung des Chitosans folgendes Verfahren als zweckmäßig:

Ein Quantum von 50 bis 150 g der mit Kalilauge ausgekochten und ausgewaschenen Lamellen (s. oben) wurde (am besten noch etwas feucht) mit dem fünffachen Gewicht grob gepulverten Ätzkalis innig gemischt, das Gemenge nach Zusatz von ein wenig Wasser in einer großen Silberschale am Ölbade langsam erhitzt, bis die Temperatur des Ölbades 170 bis 180° erreicht hatte, und sodann unter Umrühren 25 bis 30 Minuten lang bei dieser Temperatur gehalten. Nach Ablauf dieser Zeit erwies sich eine herausgenommene Probe in der Regel in verdünnter Essigsäure vollkommen löslich, woraus hervorging, daß kein unverändertes Chitin mehr vorhanden war.

Die erkaltete und erstarrte Schmelze wurde gepulvert, in einem geräumigen Kolben mit dem Doppelten ihres Gewichtes Alkohol einige Stunden lang unter Rückflußkühlung am Wasserbade ausgekocht, wobei die Hauptmenge des Ätzkalis in Lösung ging und das Rohchitosan in Form von Krümeln ungelöst zurückblieb. Dieses wurde auf einem gehärteten Saugfilter abgetrennt, mit Alkohol gewaschen, sodann neuerlich im Kolben mit Alkohol ausgekocht, wieder abfiltriert, mit Wasser gewaschen und der Vorgang zuweilen noch einmal wiederholt.

Das so von Ätzkali befreite Rohchitosan wurde eventuell zur Beseitigung von unveränderten Chitinresten in Essigsäure gelöst, durch Neutralisation wieder gefällt und sodann entfärbt.

Zu diesem Behufe wurden die braunen Stücke in Wasser suspendiert und einige Gramm gepulverten Kaliumpermanganates hinzugefügt. Nach erfolgter Entfärbung, die auch bei Zimmertemperatur schnell vonstatten ging, wurde schweflige Säure in Gasform eingeleitet oder in Form einer gesättigten wässerigen Lösung hinzugefügt und einige Zeit unter öfterem Umschütteln stehen gelassen, wobei das in den Stücken abgelagerte Mangansuperoxyd bald in Lösung ging; die nunmehr farblosen Chitosanbröckel wurden auf einem gehärteten Saugfilter abgetrennt und ausgewaschen.

(Ein Verlust an Chitosan durch Bildung des auch in kaltem Wasser nicht ganz unlöslichen schwefligsauren Salzes konnte bei dieser Prozedur nicht vermieden werden.)

Überführung des Chitosans in ein kristallinisches Chlorhydrat. Zum Zwecke der Darstellung eines kristallinischen Chlorhydrats wurden die farblosen, gequollenen Chitosanstücke in einer möglichst geringen Menge heißen Wassers suspendiert und nun verdünnte Salzsäure allmählich zugesetzt. Dabei entwich bei der Entfärbungsprozedur vom Chitosan gebundene schweflige Säure, und die Stücke gingen leicht in Lösung. Nach dem Erkalten der konzentrierten Lösung wurde dieselbe mit reiner konzentrierter Salzsäure und eventuell außerdem mit Alkohol versetzt, wobei das in Wasser leicht lösliche, in konzentrierter Salzsäure dagegen nur sehr schwer lösliche Chitosanchlorhydrat in Form einer voluminösen amorphen Masse ausfiel. Der Zusatz der Salzsäure wurde derart bemessen, daß ein Mehrzusatz im Filtrat keine weitere Fällung bewirkte; ein großer Überschuß von Salzsäure wurde aber vermieden. Das amorphe Chlorhydrat wurde auf einem Saugfilter gesammelt, sodann in möglichst wenig heißen Wassers gelöst und die Lösung in einem Rundkolben allmählich mit gerade so viel konzentrierter Salzsäure versetzt, daß eine abgegossene Probe in der Siedehitze vollständig klar erschien, beim Erkalten jedoch

eine reichliche Fällung gab. Nunmehr wurde die durch den Salzsäurezusatz bewirkte voluminöse Fällung durch Aufkochen gelöst und die Lösung äußerst langsam erkalten gelassen. Es wurde dies am besten in der Weise erzielt, daß der die siedend heiße Lösung enthaltende Kolben in ein sehr großes Blechgefäß mit heißem Wasser eingetaucht und in dem letzteren erkalten gelassen wurde. Das Erkalten wurde durch Umwickeln mit Tüchern, eventuell auch durch Eingraben des Blechgefäßes in Sand noch weiter verzögert.

Durch dieses Vorgehen gelang es in der Regel, eine Abscheidung des Chlorhydrats in den weiter unten zu beschreibenden charakteristischen Kristallformen zu erzielen.

Das so erhaltene Präparat wurde auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt und eventuell noch ein oder mehrere Male in ganz analoger Weise aus heißer Salzsäure oder aber aus Wasser umkristallisiert (s. unten).

Schließlich wurde das Kristallpulver auf einem gehärteten Saugfilter erst mit 95 proz. Alkohol, dann mit absolutem Alkohol chlorfrei gewaschen, zum Zwecke der Beseitigung der letzten Wasserreste ein oder mehrere Tage unter absolutem Alkohol belassen, der Alkohol durch wasserfreien Äther verdrängt und das Präparat schließlich im Vakuum über Schwefelsäure und Paraffin getrocknet.

Bei genauer Einhaltung des beschriebenen Verfahrens gelang es, den Verlust an Chitosan durch Glykosaminspaltung unter Einwirkung der Salzsäure, wenn nicht ganz zu vermeiden, so doch sehr einzuschränken. Die Ausbeute betrug im günstigsten Falle 45 g kristallinischen Chlorhydrates aus 140 g trockener entkalkter Sepienschulpen.

Darstellung des Chitosanchlorhydrats auf dem Umwege des schwefligsauren Salzes. Bei einem Versuche schlugen wir folgendes Darstellungsverfahren ein, das uns zu einem reinen Präparat, jedoch in wenig befriedigender Ausbeute führte:

Das wie oben dargestellte Rohchitosan wurde in Essigsäure gelöst und die Lösung durch Permanganatzusatz entfärbt. Zur Beseitigung des abgeschiedenen Mangansuperoxyds wurde schweflige Säure in Gasform eingeleitet. Aus der nunmehr geklärten Lösung fiel bei weiterem Einleiten von schwefliger Säure Chitosansulfit aus. Dasselbe wurde nach Alkoholzusatz abfiltriert, durch Waschen mit kaltem Wasser von anorganischen Beimengungen befreit, in heißem Wasser gelöst und in die Lösung gasförmige Salzsäure unter Eiskühlung eingeleitet, worauf das Chitosan in Form seines Chlorhydrats ausfiel. Das Präparat wurde mit Alkohol chlorfrei gewaschen und aus heißem Wasser umkristalliert, wobei sich das voll-

kommen aschefreie Chlorhydrat in der Kälte (bei etwa 5°) in Form feinster mikroskopischer Nädelchen abschied.

Überführung des Chlorhydrats in ein Bromhydrat. Zur Darstellung eines bromwasserstoffsauren Salzes wurde eine Lösung des reinen Chlorhydrats mit einem Überschuß von alkoholischer Natronlauge versetzt, wobei das in Wasser unlösliche freie Chitosan in Form von Flocken ausfiel. Das auf dem Filter chlorfrei gewaschene Chitosan wurde in heißem Wasser suspendiert, durch Zusatz von etwas mehr als der berechneten Menge Bromwasserstoffsäure gelöst; bei weiterem Zusatz von konzentrierter Bromwasserstoffsäure fiel das Chitosanbromhydrat aus. Dasselbe wurde abfiltriert, durch Waschen mit Alkohol von anhaftender Bromwasserstoffsäure befreit, zweimal aus Wasser umkristallisiert, wieder in Wasser gelöst, die etwas gefärbte Lösung mit Permanganat entfärbt, die Mangansuperoxydabscheidung in schwefliger Säure gelöst, der Überschuß von Schwefeldioxyd am Wasserbade vertrieben, das Chitosan aus der eingeengten Lösung wieder mit konzentrierter Bromwasserstoffsäure gefällt und das Bromhydrat schließlich noch einmal aus Wasser umkristallisiert. Das Entwässern und Trocknen des Präparates zum Zwecke der Elementaranalyse erfolgte in der beim Chlorhydrat beschriebenen Weise.

3. Eigenschaften.

Reaktionen. Das Chitosan ist in Wasser unlöslich und fällt aus den wässerigen Lösungen seiner Salze auf Alkalizusatz amorph aus. Das salzsaure und essigsaure Salz sind in Wasser leicht löslich, das bromwasserstoffsaure Salz noch leichter; das schwefligsaure Salz ist ziemlich schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser.

Die wässerigen Lösungen der Chitosansalze werden durch konzentrierte Chlorwasserstoff- oder Bromwasserstoffsäure ausgefällt, durch einen großen Überschuß dieser Säuren wieder gelöst. Die Niederschläge lösen sich in der Wärme, um beim Erkalten wieder auszufallen.

Sehr konzentrierte Lösungen geben mit den Salzen der alkalischen Erden und der Schwermetalle voluminöse, gallertige Niederschläge; verdünnte Lösungen werden dagegen zögernd oder auch gar nicht gefällt.

Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Jodquecksilberkalium und Jodwismutkalium bewirken auch in stark verdünnten Lösungen voluminöse, beim Erwärmen sowie in verdünnten Säuren

unlösliche Niederschläge. Dagegen sind manche andere sogenannte Alkaloidfällungsmittel, wie Tannin, Pikrinsäure, Jodjodkalium und Ferrocyankalium nur befähigt, konzentriertere Chitosanlösungen zu fällen.

Chitosan vermag weder Fehlingsche Flüssigkeit, noch ammoniakalische Silberlösung zu reduzieren, noch auch mit Phenylhydrazin Additionsprodukte zu liefern.

Chitosan wird von Jodjodkalium allein nicht gefärbt; nimmt jedoch bei weiterem Zusatz von Chlorzink ein schön rotviolettes Kolorit an; dieses verschwindet beim Erwärmen. Die Gegenwart von Alkohol, Äther, Aceton und dergleichen verhindert die Reaktion.

Bei vorsichtigem Zusatz von Brom wird aus einer Lösung von Chitosanchlorhydrat ein scharlachrotes körniges Additionsprodukt ausgefällt, welches seinen ganzen Bromgehalt bereits beim Erwärmen mit Wasser, sowie auch bei Zusatz von Alkohol, Äther oder Aceton mit der größten Leichtigkeit einbüßt.

Beim Schütteln einer alkalischen Suspension von Chitosan mit Benzoylchlorid oder Benzolsulfochlorid kommt es zur Abscheidung körniger Additionsprodukte.

Bei hydrolytischer Spaltung des Chitosans durch Säuren in der Wärme tritt Glykosamin und Essigsäure auf (s. unten).

Das Chitosan wird von Permanganat mit großer Leichtigkeit schon in der Kälte angegriffen. Die Oxydation scheint unter Umständen bis zu Kohlensäure, Wasser und Ammoniak als Endprodukten führen zu können.

Kristallformen. Beim Umkristallisieren des Chitosanchlorhydrats aus nicht allzu verdünnter Salzsäure in der früher beschriebenen Art sahen wir sehr eigentümliche mikroskopische Kristallformen bei den verschiedensten Präparationen immer und immer wiederkehren; dieselben dürfen als für diese Verbindung durchaus charakteristisch bezeichnet werden.

Bei flüchtiger Beobachtung fallen zunächst Formen ins Auge, die man für von oben gesehene Oktaeder halten könnte. Bei genauerem Zusehen gewahrt man aber in der Mitte eine Delle und bemerkt, daß die Ecken allenthalben abgerundet sind; auch fällt es auf, daß man neben diesen Kristallen ganz anders gestaltete Gebilde sieht, und zwar einerseits biskuitähnliche Formen, andererseits aber Formen, welche etwa mit Hanteln mit sehr kurzem, dickem Stiele verglichen werden können.

Die Deutung dieser Gebilde verdanken wir Herrn Hofrat Sigmund Exner, der die besondere Freundlichkeit hatte, die-

selben mittels seines Mikrorefraktometers zu untersuchen, eines Instrumentes, welches die Plastik von mikroskopischen Formdetails zu erkennen gestattet, die sich sonst leicht der Wahrnehmung entziehen.

Man kann sich nun die Plastik der Gebilde etwa in folgender Weise vergegenwärtigen:

Man denke sich auf den beiden Flächen einer quadratischen Grundplatte je vier halbe der Länge nach geteilte Ellipsoide derart aufgesetzt, daß die langen Achsen der Ellipsoide den Diagonalen der quadratischen Grundplatte entsprechend orientiert sind, und jedem Quadranten demnach ein Ellipsoid entspricht. Da die medialen Enden der Ellipsoide nicht ganz bis zur Mitte der Grundplatte reichen, bleibt im Zentrum des Gebildes oberhalb und unterhalb der Grundplatte eine tiefe Delle. Die peripheren Enden der vier Ellipsoide runden die Ecken der Grundplatte ab; ihre Seitenflächen sind durch vier Täler mit muldenförmig ausgerundetem Boden getrennt.

Betrachtet man nun diese Gebilde von oben her, so kann bei entsprechender Einstellung, welche die den Diagonalen entsprechend liegenden Wölbungen der vier Ellipsoide hervortreten läßt, der Eindruck von tetragonalen Pyramiden entstehen, wie denn auch Hoppe-Seyler (s. oben), der diese Formen offenbar gesehen hat, von „quadratischen Kristallen" spricht. Bei aufmerksamerer Beobachtung wird es aber auffallen, daß die vier vermeintlichen Pyramidenkanten nicht zu einer Spitze zusammenlaufen, sondern daß sich in der Mitte des Gebildes eine tiefe Delle befindet. Betrachtet man nun aber die Gebilde nicht von oben her, sondern von der Seite, so wird das Bild ein wesentlich verschiedenes sein, je nachdem die Blickrichtung senkrecht auf die Seite oder aber auf die Diagonale der Grundplatte fällt. Im ersteren Falle erscheinen die Konturen der Ellipsoide in sanfter Böschung gegen das breite Muldental abfallend, und man sieht Biskuitformen. In letzterem Falle aber sieht man die Wölbung der Ellipsoide steil gegen die tiefe zentrale Delle abfallen; die beobachtete Form gleicht dann in ihren Umrissen einer Hantel mit kurzem, dickem Stiele.

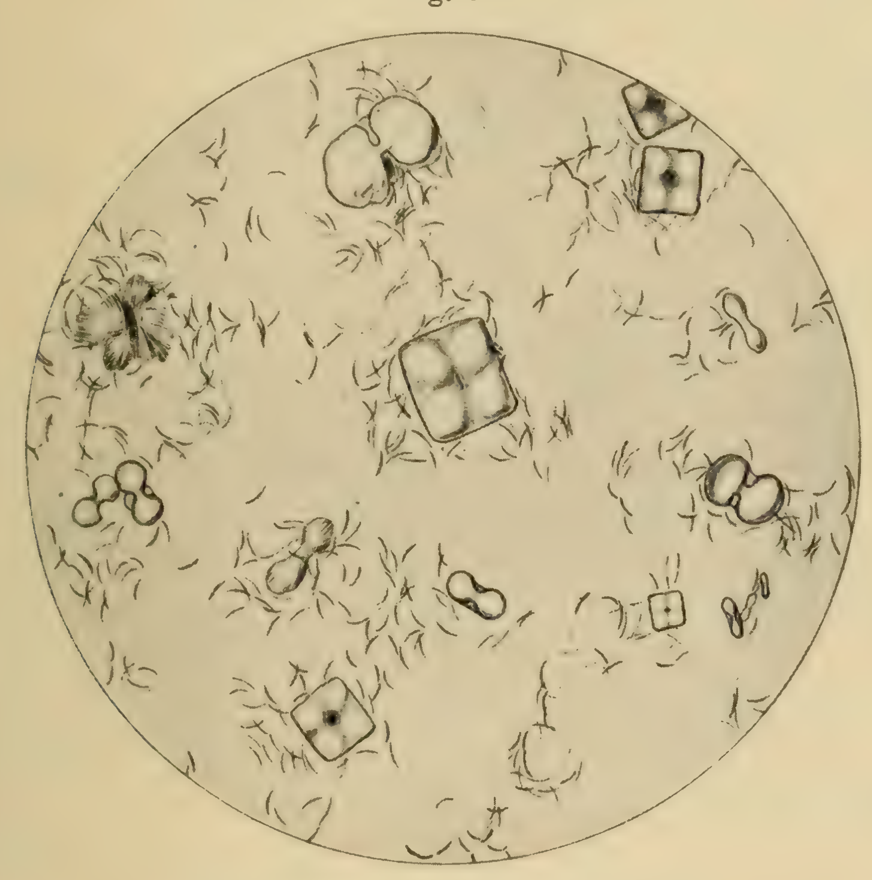
Alle anderen Gebilde, die man etwa bei Betrachtung der Präparate zu sehen bekommt, erklären sich ungezwungen als Übergänge zwischen den geschilderten Formen (Fig. 3).

Herr Dr. Himmelbauer, der so freundlich war, das Verhalten der Kristalle im polarisierten Lichte mit den optischen Hilfsmitteln des hiesigen mineralogisch-petrographischen Universitätsinstituts zu untersuchen, berichtete darüber folgendes: „Es handelt sich um tetragonale oder vielleicht besser gesagt pseudotetragonale Kristalle. Die Endfläche ist quadratisch, die Pinakoidfläche rechteckig mit stark verkürzter vertikaler Kante. Es hat den Anschein, als bestünde der Kristall aus vier kugeligen Segmenten, die selbst wieder einen büschelartigen Aufbau aufweisen. Es zeigen nämlich die auf der Endfläche liegenden Kristalle infolge der geringen Dicke eine schwache Aufhellung, die auf den Seitenflächen

liegenden starke Aufhellung, und zwar im polarisierten Lichte das für büschelige Aggregate charakteristische „Brewstersche Kreuz“.

Zahlreiche Versuche, durch oftmaliges Umkristallisieren (dieses wurde in einem Falle fünfmal wiederholt), sehr langsames Abkühlen, Eindunsten und dergleichen größere, der Kristallmessung zugängliche Formen zu erhalten, blieben vergeblich. Wir vermochten nur festzustellen, daß die beschriebenen Formen öfters einem Haufwerk äußerst feiner, kurzer, leicht gekrümmter Nadeln (in ihrem

Fig. 3.



Aussehen an Kommabazillen erinnernd) Platz machten. Offenbar sind es eben diese gekrümmten Nädelchen, welche durch eine ganz eigentümliche Art der Aneinanderlegung die beschriebenen charakteristischen Formen aufbauen.

Schließlich sei erwähnt, daß wir einmal beim spontanen Eindunsten einer Lösung von bromwasserstoffsaurem Chitosan auf einem Uhrglase zierliche, girlandenförmige, aus Nädelchen zusammengesetzte Ranken erhielten.

Physikalisches Verhalten. Die Lösungen der Chitosansalze sind optisch-aktiv und drehen die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. Eine 1 proz. Lösung von Chitosanchlorhydrat zeigte bei

Beobachtung mit einem Saccharimeter von Schmidt & Hänsch im 1 Dezimeter-Rohr bei 20° eine Linksdrehung von 0,17°, woraus sich die spezifische Drehung $\alpha_D = -17$ ergibt. (Hoppe-Seyler und Araki[1]) hatten für das Chitosan des Hummerpanzers $\alpha_D = -17{,}7$ bis 17,9 gefunden.)

Molekulargewicht. Die Feststellung einer Gefrierpunktserniedrigung wurde durch die geringe Löslichkeit der Chitosansalze in kaltem Wasser unmöglich gemacht. Lösungen von 0,4 Proz. und selbst von noch geringerem Gehalte an Chlorhydrat trübten sich in der Nähe des Nullpunktes unter Abscheidung geformter Partikelchen.

Die Siedemethode ergab bei Eintragung von:

0,70 g	Chitosanchlorhydrat	in 30	ccm	Wasser	eine	Siedepunkterhöhung	von 0,015°
1,33 „	„	30	„	„	„	„	„ 0,030°
0,89 „	„	30	„	„	„	„	„ 0,013°

Daß eine genauere Berechnung des Molekulargewichtes angesichts derartiger, nahe an der Fehlergrenze der Methode stehender Ausschläge ausgeschlossen erscheint, ist selbstverständlich. Nur so viel ergibt sich ohne weiteres, daß die Formel von Araki, welche dem Chitosan ein Molekulargewicht von 418 zuschreibt, ihrer Größenordnung nach unmöglich richtig sein kann und mindestens verdoppelt, wenn nicht vervielfacht werden muß. Handelt es sich aber etwa (und mancherlei spricht zugunsten dieser Annahme) beim Chitosan um eine hochmolekulare kolloide Substanz, so gilt das Bedenken, daß möglicherweise überhaupt keine echte Lösung, sondern eine Suspension vorliege, und daß der geringe Ausschlag des Thermometers gar nicht auf osmotische Druckkräfte bezogen werden dürfe.

4. Analytische Zusammensetzung.

1. Kristallinisches Chitosanchlorhydrat. (Darstellung s. o.) Im Vakuum bei Zimmertemperatur etwa eine Woche lang getrocknet.

0,1805 g Substanz gaben:

0,2207 g CO_2, entsprechend 33,34 Proz. C.
0,0983 g H_2O, „ 6,09 „ H.

0,2021 g Substanz gaben:

10,6 ccm N (20°, 761 mm), entsprechend 6,01 Proz. N.

0,1953 g Substanz gaben:

0,0723 g AgCl (Carius), entsprechend 9,15 Proz. Cl.

[1]) l. c., S. 163.

C	33,34 Proz.	
H	6,09 „	
N	6,01 „	Atomverhältnis:
Cl	9,15 „	$C_{6,48} H_{14,19} N_1 Cl_{0,60} O_{6,65}$
O	45,41 „	
	100,00 Proz.	

2. Kristallinisches Chitosanchlorhydrat. Dasselbe Präparat wie 1, aber bei 108° getrocknet.

0,1719 g Substanz gaben:

0,2120 g CO_2, entsprechend 33,64 Proz. C.
0,0899 g H_2O, „ 5,79 „ H.

0,1306 g Substanz gaben:

7,0 ccm N (22°, 758 mm), entsprechend 6,06 Proz. N.

0,1875 g Substanz gaben:

0,0405 g Ag Cl (Carius), entsprechend 5,34 Proz. Cl.

C	33,64 Proz.	
H	5,79 „	
N	6,06 „	Atomverhältnis:
Cl	5,34 „	$C_{6,47} H_{13,38} N_1 Cl_{0,32} O_{7,15}$
O	49,17 „	
	100,00 Proz.	

3. Kristallinisches Chitosanchlorhydrat. Das frisch bereitete, sorgfältig mit absolutem Alkohol und Äther entwässerte Präparat wurde nur einen Tag im Vakuum bei Zimmertemperatur über Schwefelsäure getrocknet.

0,2889 g Substanz, in Wasser gelöst, wurden mit $^1/_{10}$ n-Na O H unter Anwendung von Phenolphthalëin titriert. Verbraucht 12,6 ccm $^1/_{10}$ n-Na O H, entsprechend 15,48 Proz. Cl.

Dasselbe Präparat wurde nach längerem Stehen im Vakuum analysiert.

0,2016 g Substanz gaben:

0,0882 g Ag Cl (Carius), entsprechend 10,83 Proz. Cl.

0,1975 g Substanz gaben:

10,7 ccm N (10,5°, 717 mm), entsprechend 6,18 Proz. N.

Das Chlorhydrat, einen Tag lang bei 100° getrocknet:

0,1392 g Substanz gaben:

0,0265 g Ag Cl (Carius), entsprechend 4,70 Proz. Cl.

Es ergibt sich sonach für das nur einen Tag bei Zimmertemperatur getrocknete Präparat[1]) die Relation $N_1 Cl_{0,99}$, für das längere Zeit bei Zimmertemperatur getrocknete Präparat die Re-

[1]) Der N-Gehalt wird, wie die vorangehenden Analysen lehren, bei der Chlorabspaltung nicht merklich verschoben.

lation $N_1 Cl_{0,69}$, für das einen Tag bei 100⁰ getrocknete Präparat die Relation $N_1 Cl_{0,31}$.

4. Amorphes Chitosanchlorhydrat. (Aus der salzsauren Lösung des Chitosans durch Alkohol-Äther gefällt, säurefrei gewaschen, durch zweimaliges Umfällen aus wässeriger Lösung mit Alkohol gereinigt, mit absolutem Alkohol und Äther entwässert, im Vakuum bei Zimmertemperatur längere Zeit getrocknet.)

0,1255 g Substanz neutralisierten:

5,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH, entsprechend 14,78 Proz. Cl.

Eine Kjeldahl-Bestimmung ergab 6,05 Proz. Cl, woraus sich die Atomrelation $N_1 Cl_{0,98}$ ergibt.

5. Kristallinisches Bromhydrat. (Erst im Vakuum bei Zimmertemperatur, dann bei 100⁰ getrocknet.)

0,2074 g Substanz gaben:

0,2653 g CO_2, entsprechend 34,87 Proz. C.
0,1117 g H_2O, „ 6,03 „ H.

0,1214 g Substanz gaben:

0,1558 g CO_2, entsprechend 35,01 Proz. C.
0,0695 g H_2O, „ 6,34 „ H.

0,1284 g Substanz gaben:

0,1636 g CO_2, entsprechend 34,73 Proz. C.
0,0720 g H_2O, „ 6,23 „ H.

0,1931 g Substanz gaben:

0,0092 g AgBr (Carius), entsprechend 1,94 Proz. Br.

0,1173 g Substanz gaben:

0,0060 g AgBr (Carius), entsprechend 2,13 Proz. Br.

0,2051 g Substanz gaben:

11,6 ccm N (22⁰ 759 mm), entsprechend 6,40 Proz. N.

0,1284 g Substanz gaben:

7,0 ccm N (10⁰ 719 mm), entsprechend 6,21 Proz. N.

C	34,87 Proz.	35,01 Proz.	34,73 Proz.	Mittel 34,87 Proz.
H	6,03 „	6,34 „	6,23 „	„ 6,20 „
N	6,40 „	6,21 „	— „	„ 6,30 „
Br	1,94 „	2,13 „	— „	„ 2,04 „
O	— „	— „	— „	„ 50,59 „
				100,00 Proz.

Diesem Mittelwerte entspricht das Atomverhältnis

$$C_{6,47} H_{13,71} N_1 Br_{0,06} O_{7,04}.$$

0,1623 g des Bromhydrats (jedoch nur bei Zimmertemperatur, nicht bei 100⁰ getrocknet), in Wasser gelöst und mit $^1/_{10}$ n-NaOH titriert (Phenolphthalein), neutralisierten 5,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH, was, auf HBr bezogen, einem Bromgehalt von 25,6 Proz. Br. entsprechen würde.

6. Freies Chitosan aus dem kristallinischen Chlorhydrat. Die Menge von 5 g eines schön kristallisierten Chlorhydrats wurde in Wasser gelöst, die Lösung mit Natronlauge gefällt, der Niederschlag auf einem gehärteten Saugfilter chlorfrei gewaschen, mit Wasser verrieben, neuerlich abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, mit absolutem Alkohol verrieben und 1 Tag unter absolutem Alkohol belassen, in analoger Weise mit absolutem Äther behandelt, lufttrocken staubfein gepulvert und zehn Tage lang im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet, ohne daß Gewichtskonstanz erzielt wurde.

0,1507 g Substanz gaben:

0,2377 g CO_2, entsprechend 43,00 Proz. C.
0,0940 g H_2O, „ 6,90 „ H.

0,1405 g Substanz gaben:

0,2204 g CO_2, entsprechend 42,78 Proz. C.
0,0879 g H_2O, „ 6,90 „ H.

0,1284 g Substanz gaben:

8,0 ccm Stickstoff (9,5°, 729 mm), entsprechend 7,23 Proz. N.

C	43,00 Proz.	42,78 Proz.	Mittel 42,89 Proz.
H	6,90 „	6,90 „	„ 6,90 „
N	7,23 „	— „	„ 7,23 „
O	— „	— „	„ 42,98 „
			100,00 Proz.

Diesen Mittelwerten entspricht die Atomrelation:

$C_{6,92} H_{13,36} N_1 O_{5,20}$.

7. Freies Chitosan aus dem kristallinischen Chlorhydrat. Aus 5 g eines anderen Präparates von Chitosanchlorhydrat wurde das freie Chitosan wie in 6. bereitet, jedoch nicht bei Zimmertemperatur, sondern bei 97° 16 Tage lang getrocknet, ohne daß jedoch Gewichtskonstanz erzielt wurde.

0,2002 g Substanz gaben:

0,3418 g CO_2, entsprechend 46,57 Proz. C.
0,1200 g H_2O, „ 6,64 „ H.

0,2258 g Substanz gaben:

0,3804 g CO_2, entsprechend 45,93 Proz. C.
0,1354 g H_2O, „ 6,59 „ H.

0,1337 g Substanz gaben:

9,7 ccm N (9,5°, 726 mm), entsprechend 8,37 Proz. N.

C	46,57 Proz.	45,93 Proz.	Mittel 46,25 Proz.
H	6,64 „	6,59 „	„ 6,61 „
N	8,37 „	— „	„ 8,37 „
O	— „	— „	„ 38,77 „
			100,00 Proz.

Atomverhältnis: $C_{6,47} H_{11,0} N_1 O_{4,06}$.

8. Freies Chitosan aus dem kristallinischen Bromhydrat. Aus dem Reste des Analysenpräparates 5. wurde freies Chitosan wie oben dargestellt, 7 Tage lang bei 95° getrocknet (keine Gewichtskonstanz).

0,1008 g Substanz gaben:

0,1755 g CO_2, entsprechend 47,52 Proz. C.
0,0628 g H_2O, „ 6,84 „ H.

9. Freies Chitosan aus dem kristallinischen Chlorhydrat. Aus 10 g eines sehr reinen kristallinischen Chlorhydrats wurde wie oben freies Chitosan dargestellt, chlorfrei gewaschen, sodann aber wieder in Essigsäure gelöst, wieder mit Natronlauge gefällt, dann wie 6. weiter behandelt und vier Wochen im hochgradigen Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur getrocknet.

0,1930 g Substanz gaben:

0,3170 g CO_2, entsprechend 44,82 Proz. C.
0,1235 g H_2O, „ 7,09 „ H.

0,1175 g Substanz gaben:

8,8 ccm N (11°, 723 mm), entsprechend 8,56 Proz. N.

C	44,82 Proz.	
H	7,09 „	
N	8,56 „	Atomverhältnis:
O	39,53 „	$C_{6,12}\ H_{11,65}\ N_1\ O_{4,04}$
	100,00 Proz.	

Eine Erörterung der sich aus den Analysenzahlen ergebenden Folgerungen soll erst im Schlußkapitel im Zusammenhange mit den Ergebnissen der Spaltungsversuche und des Studiums von Additionsprodukten ihren Platz finden.

5. Spaltungs- und Additionsprodukte.

Bestimmung der hydrolytisch abspaltbaren Essigsäure. Bereits Araki[1]) hatte versucht, die bei Säurespaltung des Chitosans auftretende Essigsäure quantitativ zu bestimmen, indem er das Chitosan im zugeschmolzenen Rohre mit konzentrierter Salzsäure auf 110° erhitzte, sodann den Rohrinhalt der Destillation unterwarf, das Destillat in Barytwasser auffing und nach Beseitigung der Salzsäure mit Silberoxyd die Essigsäure in Form ihres Barytsalzes zur Wägung brachte. Die Ausbeute an Essigsäure betrug 5 bis 9 Proz.; daß es sich dabei um keinen glatten Spaltungsvorgang gehandelt haben konnte, geht schon aus dem Umstande hervor, daß neben Essigsäure anscheinend auch Ameisensäure aufgetreten war, und daß der Rohrinhalt nach dem Erhitzen eine braunschwarze Färbung zeigte. Es hatten sich sonach reichlich Melanine als Nebenprodukte gebildet.

[1]) l. c., S. 163.

Es gelang uns, die Melaninbildung bei Einwirkung konzentrierter Salzsäure auf Chitosan vollständig hintanzuhalten, indem wir Zinnchlorür hinzufügten; dann blieb die Lösung auch nach stundenlanger Einwirkung der siedenden Säure fast ungefärbt, und die Spaltung vollzog sich glatt und ohne störende Nebenreaktionen.

Es wurden nun 0,6951 g salzsaures Chitosan mit 20 ccm konzentrierter Salzsäure und 1 g Zinnchlorür in einem Kölbchen mit aufgesetztem Rückflußkühler vier Stunden lang gekocht. Das obere Kühlerende war mit drei hintereinander geschalteten, mit konzentrierter Natronlauge beschickten Waschflaschen verbunden, derart, daß ein Entweichen saurer Produkte ausgeschlossen war; eine Ventilvorrichtung verhinderte das Zurücksteigen der Lauge in das Kölbchen. Nach beendeter Zersetzung wurde erkalten gelassen, der Inhalt des Kölbchens und der Vorlagen vereinigt, Natronlauge hinzugefügt, bis Phenolphthaleïn eben den Eintritt alkalischer Reaktion anzeigte, die Flüssigkeit auf dem Wasserbade eingeengt, in einen Destillationskolben mit doppelt gebohrtem Pfropfen übergespült, mit Phosphorsäure angesäuert und nunmehr im Vakuum (100 bis 200 mm) aus dem siedenden Wasserbade abdestilliert. Die Vorlage war mit zwei Waschflaschen, welche mit titrierter Natronlauge beschickt waren, in Verbindung. Die Destillation wurde unter Nachsaugen von Wasser und Eindampfen bis zur Trockne so lange wiederholt (etwa 12 mal oder öfter), als noch wahrnehmbare Säuremengen übergingen. Die Titration ergab 28,6 ccm $^1/_{10}$ n-Säure, oder als Essigsäure berechnet, 0,1716 g = 24,68 Proz. Essigsäure.

Bei einem weiteren Versuche wurde, um die Dauer der Destillation abzukürzen, zum Ersatz der verdampften Flüssigkeit statt Wasser Xylol benutzt. Es schien uns dies insofern zweckmäßig, als das Xylol einen etwas höheren Siedepunkt besitzt als Essigsäure, daher geeigneter sein dürfte, die letzten Essigsäurereste aus dem Destillationsrückstande mitzureißen, als Wasser.

0,5950 g salzsaures Chitosan wurde nun wie oben behandelt, die Destillation im Vakuum jedoch aus dem Ölbade bei 120° bis 140° vorgenommen und die verdampfte Flüssigkeit durch je 50 ccm reinen Xylols ersetzt. Nach dreimaliger Wiederholung des Vorganges erwiesen sich die letzten Tropfen des Destillates neutral. Die Titration des Destillates erfolgte nach Zusatz von so viel Alkohol, daß eine Mischung der wässerigen Schicht mit dem Xylol eintrat. Die übergegangene Säure neutralisierte 25,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH, entsprechend 0,1512 g = 25,41 Proz. Essigsäure.

Aus dem Mittelwerte dieser beiden Bestimmungen

$$\left.\begin{array}{l}24{,}68\ \text{Proz.}\\ 25{,}41\ \ „\end{array}\right\}\ \text{Mittel}\ 25{,}04\ \text{Proz.}$$

und dem Stickstoffgehalte des betreffenden Präparates von Chitosanchlorhydrat

$$N = 6{,}05\ \text{Proz.}$$

ergibt sich die Relation:

$$N : \text{Essigsäure} = 1 : 0{,}97,$$

d. h. also: Im Chitosan entspricht je einem Stickstoffatom annähernd je ein Molekül hydrolytisch abspaltbarer Essigsäure.

Es mußte nun aber noch festgestellt werden, ob man berechtigt sei, die Hauptmenge der hydrolytisch abspaltbaren Essigsäure auf im Chitosan präformierte Acetylgruppen zurückzuführen, oder ob etwa ein großer Teil der Essigsäure als Zersetzungsprodukt des Glykosamins aufgefaßt werden könnte. Wollte doch Sundwik[1]) die gesamte bei der Chitinspaltung auftretende Essigsäure auf diese Quelle zurückführen und das Chitin als reines Aminderivat eines Kohlehydrates hinstellen, welche Auffassung allerdings durch den von Fränkel und Kelly[2]) erbrachten Nachweis eines acetylierten Glykosamins unter den Spaltungsprodukten des Chitins hinfällig geworden ist.

Es wurde nun 0,943 g salzsaures Glykosamin (Merck) genau in der vorhin beschriebenen Weise der dreistündigen Einwirkung siedender konzentrierter Salzsäure unterworfen. Das gesamte Destillat neutralisierte 5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH, entsprechend 0,03 g Essigsäure = 3,2 Proz.

Die sehr großen bei obigen Versuchen erhaltenen Essigsäuremengen können also sicherlich nicht von einer Zersetzung des Glykosamins herrühren.

Bestimmung des hydrolytisch abspaltbaren Glykosamins. 0,6862 g salzsaures Chitosan wurden drei Stunden lang unter Zusatz von 1 g Zinnchlorür mit konzentrierter Salzsäure gekocht; dann wurde mit Wasser verdünnt, das Zinn durch Schwefelwasserstoff beseitigt, das Filtrat eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung auf 100 ccm aufgefüllt und nach Fehling titriert. 12,1 ccm dieser Lösung reduzierten 10 ccm Fehlingscher Flüssigkeit. Daraus ergab sich für die Gesamtmenge ein Gehalt von 0,4132 g Glykosamin = 60,22 Proz. des Ausgangsmaterials.

Bei einem weiteren Versuche gab in gleicher Weise 0,7481 g salzsaures Chitosan 0,4505 g Glykosamin, was wiederum 60,22 Proz. entspricht. Unter Berücksichtigung des Stickstoffgehaltes des betreffenden Präparates (N = 6,18 Proz.) ergibt sich die Relation

N : Glykosamin = 1 : 0,75.

Je 4 Atomen im salzsauren Chitosan enthaltenen Stickstoffs würden demnach je 3 Moleküle hydrolytisch abspaltbaren Glykos-

[1]) E. Sundwik, Zur Konstitution des Chitins. Zeitschr. f. physiol. Chemie 5, 385 (1881).

[2]) l. c.

amins entsprechen (nämlich unter der Voraussetzung, daß gar keine anderen die Fehlingsche Lösung reduzierenden Substanzen außer dem Glykosamin in Betracht kommen).

Verhalten gegen Essigsäureanhydrid. Ch. Fischer und Araki stellten durch Erhitzen von Chitosan mit Essigsäureanhydrid im zugeschmolzenen Rohre auf 135° ein schwer lösliches Additionsprodukt dar, welches, den Analysen des letztgenannten Autors zufolge, je 2 Stickstoffatomen entsprechend 3 neu aufgenommene Acetylgruppen enthalten haben dürfte.

Um nun die Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Chitosan unter wechselnden Versuchsbedingungen zu studieren, bedienten wir uns folgenden Verfahrens:

Eine abgewogene Menge salzsauren Chitosans wurde mit einer genau abgewogenen oder abgemessenen Menge Essigsäureanhydrid in einem Kölbchen, das durch einen Glasschliff mit einem Rückflußkühler verbunden war, erhitzt. Das obere Ende des Kühlers stand, um ein Entweichen gasförmiger Produkte zu verhindern, mit einem System von (Wasser enthaltenden) Vorlagen in Verbindung. Nach beendeter Reaktion wurde das Essigsäureanhydrid durch Kochen mit Wasser verseift und titrimetisch festgestellt, wieviel Essigsäure verschwunden, also in eine durch Kochen mit Wasser nicht verseifbare Bindung übergegangen war.

Durch blinde Versuche wurde der „Titer“ des benutzten Essigsäureanhydrids, d. h. die Essigsäuremenge festgestellt, die beim Fehlen acetylierbarer Substanz nach der Verseifung tatsächlich zum Vorschein kam. Bei Anwendung eines reinen Kahlbaumschen Präparates betrug die Differenz gegenüber dem theoretisch berechneten Werte weniger als 3 Proz.

a) 0,8242 g Chitosanchlorhydrat wurde mit 2,5969 g Essigsäureanhydrid $^3/_4$ Stunden auf 100° erhitzt. Nach Verseifung ergab Titration 51,4 ccm n-NaOH. Die Berechnung erforderte 51 ccm (47,5 für das Anhydrid + 3,5 für die Salzsäure des Chlorhydrats). Es hatte sonach keine Acetylierung stattgefunden.

b) 0,9173 g des Chlorhydrats wurde mit 6 ccm des Anhydrids im Glycerinbade $2^1/_2$ Stunden lang auf etwa 137° erhitzt. Das Anhydrid befand sich in lebhaftem Sieden. Der titrimetrisch festgestellte Verlust an Essigsäure betrug (2,5 ccm n-NaOH entsprechend) 0,15 g Essigsäure, i. e. 16 Proz. des Chlorhydrats.

c) 0,9901 g des Chlorhydrats wurde mit 3,2053 g Anhydrid, dem (zur Verdünnung und um eine gleichmäßigere Befeuchtung der zu acetylierenden Substanz zu erzielen) 30 g Xylol zugesetzt waren, drei Stunden im Ölbade auf 130 bis 138° erhitzt. Der Verlust an Essigsäure betrug (7,5 ccm n-NaOH entsprechend) 0,45 g Essigsäure, i. e. 45 Proz. des Chlorhydrats.

d) 1,089 g des Chlorhydrats wurden mit 2,6725 g Anhydrid (diesmal ohne Zusatz von Xylol) fünf Stunden im Ölbade auf 125 bis 135° erhitzt.

Der Verlust an Essigsäure betrug hier (17,5 ccm n-NaOH entsprechend) 1,05 g Essigsäure, i. e. 97 Proz. des Chlorhydrats.

Diese Aufnahme würde auf je ein N-Atom im Chitosanmolekül in b) etwa $^1/_2$, in c) etwa 2, in d) etwa 4 Molekülen Essigsäure entsprechen. Da das Reaktionsprodukt aber stark gefärbt war und unsere analytischen Erfahrungen uns über die hochgradige Zersetzlichkeit des Chitosans bei höheren Temperaturen belehrt hatten, durften aus diesen Befunden keine weitgehenden Schlüsse gezogen werden.

Verhalten gegen Benzoylchlorid.

A. 2 g Chitosanchlorhydrat wurden in 200 ccm Wasser gelöst, 20 g Ätznatron hinzugefügt und die Chitosansuspension nunmehr unter Schütteln und Kühlen portionenweise mit 40 ccm Benzoylchlorid versetzt. Es kam zur Abscheidung eines körnigen Produktes. Dieses wurde mit Wasser, Alkohol und Äther sorgfältig ausgewaschen und erst bei 40°, dann im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug 2,8 g.

0,1894 g des Benzoylproduktes diente zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. Es wurden 6,4 ccm $^1/_{10}$ n-Säure verbraucht, entsprechend 0,0090 g = 4,73 Proz. N.

1,0263 g des Benzoylproduktes wurden unter Anwendung der für die Bestimmung abspaltbarer Essigsäure benutzten Versuchsanordnung 5 Stunden lang mit konzentrierter Salzsäure gekocht. Nach beendeter Zersetzung wurde der Inhalt des Zersetzungskölbchens und aller Vorlagen vereinigt, mit Natronlauge alkalisch, mit Phosphorsäure wieder sauer gemacht und der Wasserdampfdestillation unterworfen, bis die letzten Spuren flüchtiger Säure übergetrieben waren. Die Menge des Destillats betrug $8^1/_2$ Liter. Ein aliquoter Teil des Destillats wurde (zur Trennung der Benzoësäure von der Hauptmenge der Essigsäure) ausgeäthert, der Ätherrückstand titriert und daraus auf die ungefähre Menge der abgespaltenen Benzoësäure geschlossen.

Wir fanden (31,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH entsprechend) 0,38 g = 37 Proz. Benzoësäure. (Aus der Ausbeute ergab sich eine Benzoyladdition von rund 40 Proz.)

Unter Berücksichtigung des N-Gehaltes (4,73 Proz.) ergibt sich daraus für das Benzoylprodukt die Relation:

$$\text{N : Benzoësäure} = 1 : 0{,}93,$$

d. h. je einem Stickstoffatom entsprechend hatte das Chitosan annähernd einen Benzoylrest aufgenommen.

B. Aus 5 g eines anderen Präparates von Chitosanchlorhydrat wurde das Benzoylprodukt wie oben dargestellt und bei 100° getrocknet.

Das Präparat, ein schneeweißes, feines Pulver, erwies sich als ganz unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther und Chloroform, sehr schwer löslich in konzentrierter Salzsäure, Salpetersäure und Eis-

essig. Ein Gemenge von konzentrierter Schwefelsäure und Eisessig löste beim Erwärmen ohne Bräunung. Die Lösung wurde durch Wasserzusatz gefällt, die Fällung von Alkohol klar gelöst. Die Verseifung des Benzoylproduktes scheint selbst in der Kalischmelze nur sehr langsam vonstatten zu gehen.

0,1836 g Substanz gaben:

0,4221 g CO_2, entsprechend 62,69 Proz. C.
0,0874 g H_2O, „ 5,28 „ H.

0,1828 g Substanz gaben:

0,4129 g CO_2, entsprechend 61,60 Proz. C.
0,0891 g H_2O, „ 5,41 „ H.

0,1708 g Substanz gaben:

7,6 ccm N (19°, 762 mm), entsprechend 5,19 Proz. N.

0,1651 g Substanz gaben:

7,0 ccm N (19°, 759 mm), entsprechend 4,93 Proz. N.

C	62,69 Proz.	61,60 Proz.	Mittel 62,15 Proz.
H	5,28 „	5,41 „	„ 5,35 „
N	5,19 „	4,93 „	„ 5,06 „
O	— „	— „	„ 27,44 „
			100,00 Proz.

Daraus ergibt sich das Atomverhältnis:

$$C_{14,37} H_{14,73} N_1 O_{4,75}$$

und wiederum die Schlußfolgerung, daß je einem Stickstoffatom entsprechend die Aufnahme eines Benzoylrestes in das Chitosanmolekül erfolgt ist.

Nach Subtraktion eines Benzoylrestes ergibt sich für das Chitosan die Relation $C_{7,37} H_{10,73} N_1 O_{3,75}$.

6. Chitosan aus Tegumenten von Schmetterlingspuppen.

Die mitgeteilten Beobachtungen hatten uns keinen Grund gegegeben, eine Verschiedenheit des Chitosans der Mollusken von demjenigen der Arthropoden anzunehmen. Es erübrigte jedoch noch der Versuch, aus Arthropodenchitin die überaus charakteristischen Kristalle des salzsauren Chitosans darzustellen, um uns die volle Überzeugung von der Identität der Chitosane verschiedener Herkunft zu verschaffen.

Wir wählten zu diesem Versuche nicht das Chitin des Crustaceenpanzers, sondern dasjenige der Tegumente von Schmetterlingspuppen, um bei dieser Gelegenheit eine höchst auffallende Angabe von Griffith[1]) einer Nachprüfung zu unterziehen.

[1]) Griffith, La Pupine, nouvelle substance animale; Compt. rend. 65, 320–321. Bull. Acad. roy. Belg. (3) 24, 592 (1892).

Griffiths erhielt aus den Tegumenten verschiedener Schmetterlingspuppen (Pieris, Plusia, Mamestra, Noctua) durch Auskochen mit Natronlauge, Waschen mit verdünnter Säure, Wasser, Alkohol, Äther, Lösen in konzentrierter Salzsäure, Fällen mit Wasser und nochmalige Wiederholung des letztgenannten Vorganges eine Substanz, die er „Pupin" nannte. Er schrieb ihr die Formel $C_{14}H_{20}N_2O_5$ und die Fähigkeit zu, nach der Formel

$$C_{14}H_{20}N_2O_5 + 3H_2O = 2C_6H_{13}NO_2 + 2CO_2$$

durch Hydrolyse in Leucin und Kohlensäure zu zerfallen.

Um diese Angaben, denen zufolge die Tegumente der Schmetterlingspuppen also nicht wie diejenigen anderer Arthropoden aus Chitin, sondern aus einem einfachen Leucinderivat, dem „Pupin", bestehen sollten, nachzuprüfen, haben wir eine größere Anzahl von Puppen einer Art, die uns gerade zur Verfügung standen, nämlich der Deiliphila elpenor bzw. euphorbiae (Wolfsmilchschwärmer), in folgender Weise untersucht:

Die Puppen waren monatelang in sehr konzentrierter Natronlauge maceriert worden; dabei waren die Weichteile größtenteils in Lösung gegangen, und die Reste konnten sehr leicht von den unversehrten Tegumenten mechanisch abgetrennt werden. Die letzteren wurden auf einem Siebe durch fließendes Wasser vom Alkali befreit.

Die so erhaltenen durchscheinenden Tegumentstücke zeigten folgendes Verhalten: Sie gaben keine Millonsche Reaktion und erwiesen sich bei Erwärmen in konzentrierter Schwefelsäure unter Essigsäureentwickelung leicht löslich. Die Lösung in konzentrierter kochender Salzsäure erfolgte langsamer; die Lösung reduzierte Fehlingsche Flüssigkeit sehr kräftig und gab sehr schön die Reaktion von Molisch. Jodjodkalium erteilte den Stücken eine braune Färbung, die auf Zusatz von Chlorzink und Schwefelsäure in einen violetten Ton überging; die Färbung verschwand beim Erwärmen, um beim Erkalten wieder aufzutreten.

Offenbar handelte es sich also nicht um „Pupin", sondern um gewöhnliches Chitin. Es gelang auch, dieses Chitin in Chitosan überzuführen.

Zu diesem Zwecke wurden etwa 10 g der reinen Puppentegumente mit der Schere zerkleinert, mit 100 g Ätzkali und etwas Wasser eine Stunde im Ölbade auf 150 bis 180° erhitzt, wobei für eine gleichmäßige Mischung gesorgt wurde. Die erkaltete Schmelze wurde gepulvert, das Ätzkali durch Auskochen mit Alkohol beseitigt, der Rückstand sodann mit Wasser ausgewaschen, mit verdünnter Salzsäure gelöst und die Lösung mit konzentrierter

Salzsäure versetzt, wobei ein reichlicher schneeweißer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde auf dem Saugfilter gesammelt, abermals in verdünnter Salzsäure gelöst und mit so viel konzentrierter Salzsäure versetzt, daß aus der in der Siedehitze klaren Lösung beim Erkalten ein voluminöser Niederschlag ausfiel. Durch langsames Abkühlen in einem großen, mit heißem Wasser gefüllten Gefäße wurde eine Kristallabscheidung erzielt, die noch einmal in gleicher Weise umkristallisiert wurde.

Die erhaltenen Formen erwiesen sich als absolut identisch mit denjenigen des Chitosans aus Sepienschulpen.

Dadurch erscheint der Nachweis geführt, daß

1. die Tegumente der Schmetterlingspuppen nicht aus „Pupin", sondern aus gewöhnlichem Chitin bestehen;

2. daß die Chitosane aus Mollusken- und Arthropodenchitin miteinander identisch sind.

7. Schlußfolgerungen.

Es erübrigt nunmehr die Überlegung, welche Schlußfolgerungen aus der Gesamtheit des uns zur Verfügung stehenden Beobachtungsmaterials hinsichtlich der Konstitution des Chitosans gezogen werden können.

Wir sahen zunächst, daß das Chitosan nach Art eines Amins je einem Stickstoffatom entsprechend ein Molekül Salzsäure zu binden vermag:

Versuch IV/3: N : Cl = 1 : 0,99
„ IV/4: N : Cl = 1 : 0,98.

Die Bindung der Salzsäure ist aber eine außerordentlich lockere und wird bereits durch das Trocknen im Vakuum bei Zimmertemperatur zum Teil aufgehoben.

Versuch IV/3. Längere Zeit bei Zimmertemperatur getrocknetes Präparat; N : Cl = 1 : 0,69.

Versuch IV/1. 1 Woche lang getrocknetes Präp.; N : Cl = 1 : 0,60.

Versuch IV/2. Bei 108° getrocknetes Präparat; N : Cl = 1 : 0,32.

Versuch IV/3. Bei 100° getrocknetes Präparat; N : Cl = 1 : 0,31.

Ähnliche Verhältnisse gelten für die Anlagerung der Bromwasserstoffsäure. Ein Präparat, das (der titrimetischen Feststellung zufolge) nach Trocknen im Vakuum 25,6 Proz. Br enthielt, ergab, bei 100° getrocknet, einen Bromgehalt von nur 2 Proz.

Um nun aus den Analysen der Chitosansalze mit so verschiedenem Halogengehalt die Zusammensetzung des Chitosans

zu erfahren, werden wir am besten so vorgehen, daß wir die Atomrelationen, auf den Stickstoff als Einheit bezogen, berechnen:

Versuch IV/1 Chlorhydrat:

$$C_{6,48} H_{14,19} N_1 Cl_{0,60} O_{6,65} = C_{6,48} H_{13,59} N_1 O_{6,65} . HCl_{0,60}.$$

Versuch IV/2 Chlorhydrat:

$$C_{6,47} H_{13,38} N_1 Cl_{0,32} O_{7,15} = C_{6,47} H_{13,06} N_1 O_{7,15} . HCl_{0,32}.$$

Versuch IV/5 Bromhydrat:

$$C_{6,47} H_{13,71} N_1 Br_{0,06} O_{7,04} = C_{6,47} H_{13,65} N_1 O_{7,04} . HBr_{0,06}.$$

Mittlere Atomrelation des Chitosans: $C_{6,47} H_{13,42} N_1 O_{6,95}$.

Verdoppeln wir diese Formel, um sie mit der Arakis unmittelbar vergleichbar zu machen, so würde also $C_{13} H_{26} N_2 O_{14}$ etwa jene Formel sein, welche die (vom variierenden Halogengehalt abgesehen) übereinstimmende prozentische Zusammensetzung kristallinischer Chitosansalze in der einfachsten Weise zum Ausdrucke bringt.

Sie unterscheidet sich von der Formel Arakis, $C_{14} H_{26} N_2 O_{10}$, nicht nur durch das Minus von einem C, sondern in noch viel auffälligerer Weise durch ein Plus von 4 O.

Dieser Widerspruch wird uns verständlicher, wenn wir nunmehr unsere Aufmerksamkeit der Analyse der Präparate freien Chitosans zuwenden.

Chitosan.

	IV/6 10 Tage im Vakuum Proz.	Mittelwert aus Arakis Analysen Proz.	IV/9 4 Wochen im Vakuum Proz.	IV/7 10 Tage bei 97° Proz.	IV/8 1 Woche bei 95° Proz.
C .	42,89	43,82	44,82	46,25	47,52
H .	6,90	6,68	7,09	6,61	6,84
N .	7,23	7,55	8,56	8,37	—
O .	42,98	41,95	39,53	38,77	—
	100,00	100,00	100,00	100,00	—

Es ergibt sich zunächst, daß das Chitosan im freien Zustande eine labile Substanz ist, die selbst im Vakuum nicht unzersetzt getrocknet werden kann. Begreiflicherweise zeigt daher auch jedes einzelne amorphe Chitosanpräparat eine je nach Art und Intensität der Trocknung (Gewichtskonstanz vermochten wir in keinem Falle zu erzielen) variierende prozentische Zusammensetzung, trotzdem die Reinheit der aus kristallinischem Material hergestellten Präparate nicht wohl bezweifelt werden kann.

Über die Richtung, nach welcher hin sich dieser Umwandlungsvorgang vollzieht, wird man durch einen Blick auf die Atomrelationen der Präparate belehrt:

IV/6 $C_{6,92}H_{13,36}N_1O_{5,20}$
Arakis Mittelwert $C_{6,79}H_{12,33}N_1O_{4,87}$
IV/7 $C_{6,47}H_{11,00}N_1O_{4,06}$
IV/9 $C_{6,12}H_{11,55}N_1O_{4,04}$

Mittel $C_{6,56}H_{12,05}N_1O_{4,56}$

Wenn wir nun also dementsprechend eine Formel nach Arakis Schema aufstellen wollten, so müßte sie etwa $C_{13}H_{24}N_2O_9$ lauten.

Aus dieser Betrachtung ergibt sich ohne weiteres, daß die in Rede stehende Umwandlung das Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Stickstoff in keiner Weise verschiebt, vielmehr in erster Linie eine Verarmung an Sauerstoff bedeutet. An eine Anhydridbildung kann nicht gedacht werden; dazu ist der gleichzeitige Verlust an Wasserstoff viel zu gering. Wir müssen auf eine Deutung dieses Befundes, der vielleicht auf die Bildung sauerstoffreicher Komplexe bei der Entstehung von Chitosan und Chitin in der Kalischmelze zu beziehen ist, vorläufig verzichten und uns damit begnügen, die Beobachtung als solche zu verzeichnen.

Angesichts des Sauerstoffreichtums des Chitins muß der Umstand auffallen, daß das Chitosan in unseren Versuchen, je einem Stickstoffatom entsprechend, nur eine Benzoylgruppe zu binden vermochte. Ist doch z. B. das Glykosamin unter den gleichen Versuchsbedingungen ohne Schwierigkeit imstande, 3 bis 5 Benzoyle zu binden. Wir werden diesen Befund derart deuten dürfen, daß jedenfalls ein Teil der Sauerstoffatome sich im Chitosan nicht in der Hydroxylform vorfindet. Vielleicht könnte man an brückenartige O-Bindungen zwischen benachbarten Kohlenstoffketten denken, ähnlich wie sie, neueren Forschungen gemäß, in der Cellulose vermutet werden.

Das Fehlen von Aldehydgruppen im Chitosan wird durch den Mangel jedes Reduktionsvermögens sichergestellt. Dagegen halten wir uns nicht ohne weiteres für berechtigt, aus dem Mißlingen der Phenylhydrazinkuppelung den bestimmten Schluß auf das Fehlen von Ketongruppen zu ziehen. Für die Gegenwart von Carboxylen ergab sich kein Anhaltspunkt; die Substanz besitzt einen ausgesprochenen basischen Charakter.

Daß aus einem Produkt, das an sich keine Aldehydgruppen enthält, durch Hydrolyse Glykosamin entsteht, hat nichts Befremdliches. Man könnte sich z. B. Verkettung der Komplexe derart denken:

$$\begin{array}{cccccc} | & | & & | & & | \\ \mathrm{CH.NH_2} & \mathrm{CH.NH_2} + \mathrm{H_2O} & = & \mathrm{CH.NH_2} & + & \mathrm{CH.NH_2} \\ | & | & & | & & | \\ \mathrm{C} & \!\!=\!\!=\!\!=\!\!=\mathrm{C} & & \mathrm{COH} & & \mathrm{COH} \\ \diagdown & \diagup & & & & \\ \multicolumn{2}{c}{\mathrm{O}} & & & & \end{array}$$

Im Chitosan entspricht annähernd je einem Atom Stickstoff ein Atom hydrolytisch abspaltbare *Essigsäure* und $^3/_4$ Atom *Glykosamin*. Man darf daher annehmen, daß alle Glykosaminkomplexe im Chitosan acetyliert sind, daß sich aber daneben noch eine andere kohlenstoffärmere acetylierte Stickstoffverbindung vorfindet. Es ergibt sich dies schon aus dem Umstande, daß die Relation N : C im Chitosan $1:6^1/_2$ beträgt; bestünde das Chitosan ausschließlich aus acetylierten Glykosaminen, so müßte natürlich die Relation 1 : 8 betragen. Da ein Präparat von Chitosanchlorhydrat bei der Säurespaltung 25 Proz. (= 18 Proz. CH_3CO) Essigsäure und 60 Proz. Glykosamin gab und überdies 9 Proz. Chlor enthielt, würde für diese unbekannte Chitosankomponente immerhin ein Spatium von über 10 Proz. übrig bleiben.

Aus dem Umstande, daß der in Glykosaminkomplexen enthaltene und überdies acetylierte Stickstoff imstande ist, Säuren zu binden, ergibt sich, daß er die Natur eines *sekundären Amins* besitzt. Auch das Verhalten gegen Benzolsulfochlorid (Bildung eines in Natronlauge unlöslichen Additionsproduktes) spricht für eine solche.

Aus den Siedepunktsbestimmungen, sowie aus dem Umstande, daß je 4 Stickstoffatomen 3 Moleküle Glykosamin entsprechen, ergibt sich, daß die Formel *Arakis* hinsichtlich ihrer Größenordnung (418) mindestens verdoppelt werden muß. Es steht aber nichts der Annahme im Wege, daß das Molekül des Chitosans vielleicht noch um sehr vieles größer sei. Schon S. *Fränkel* und *Kelly* haben darauf hingewiesen, daß die Jodreaktion des Chitosans in ihrer Eigenart durchaus dem Verhalten kolloider Kohlehydrate entspricht. Auch in mancher anderen Hinsicht (z. B. in der Art, wie Salze gelatinöse Fällungen erzeugen, wie eine selbst hochverdünnte Lösung in der Nähe des Nullpunktes gallertig erstarrt, wie das freie Chitosan immer amorph ausfällt, wie die Kristalle des Chlorhydrats gewisse Farbstoffe in sich aufnehmen) gewinnt man den Eindruck, daß man es mit einer *hochmolekularen* Substanz zu tun habe.

Wir glauben uns daher mit der objektiven Wiedergabe unserer analytischen Beobachtungen begnügen und auf die Aufstellung

einer bestimmten Formel für das Chitosan vorläufig verzichten zu sollen. Haben ja Erfahrungen auf anderen Gebieten den sehr problematischen Wert der Formelberechnung für hochmolekulare Substanzen zur Genüge dargetan.

Ob es möglich sei, vom Chitosan ausgehend, auf dem Wege systematischen Abbaues, insbesondere durch schrittweise Oxydation zu weiteren Aufschlüssen über die Struktur dieser merkwürdigen Substanz zu gelangen, sollen weitere Versuche lehren.

Zusammenfassung.

Die wesentlichsten Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen sich etwa folgendermaßen zusammenfassen:

1. Unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen gelingt es, das chlor- und bromwasserstoffsaure Chitosan in charakteristischen mikroskopischen Kristallformen zu erhalten.

2. Entgegen der von Araki aufgestellten Chitosanformel $C_{14}H_{26}N_2O_{10}$ ergab es sich, daß das Chitosan, je zwei N-Atomen entsprechend, etwa 13 C-Atome, 26 H-Atome und 14 O-Atome enthalten dürfte. Das freie Chitosan verändert sich leicht unter Sauerstoffabgabe.

3. Das Molekül des Chitosans ist mindestens zweimal, vielleicht aber um ein Vielfaches größer, als der Größenordnung der Arakischen Formel entspricht.

4. Das Chitosan enthält weder Aldehyd- noch Carboxylgruppen; sein Stickstoff trägt den Charakter eines sekundären Amins.

5. Das Chitosan vermag je einem N-Atom entsprechend ein Molekül HCl zu binden; die Bindung ist jedoch eine lockere, derart, daß ein Teil der Säure bereits beim Trocknen im Vakuum abgegeben wird.

6. Durch Säurespaltung wurden aus dem Chitosanchlorhydrat annähernd 25 Proz. Essigsäure und 60 Proz. Glykosamin erhalten. Einem N-Atom entspricht annähernd 1 Molekül Essigsäure und $^3/_4$ Molekül Glykosamin. Alle im Chitosanmolekül vorhandenen Glykosaminkomplexe scheinen acetyliert zu sein. Daneben dürfte aber noch eine kohlenstoffärmere acetylierte Stickstoffverbindung im Molekül vorkommen.

7. Das Chitosan nahm bei Benzoylierungsversuchen, je einem N-Atom entsprechend, nur eine Benzoylgruppe auf. Ein erheblicher Teil seines Sauerstoffs dürfte im Molekül in anderer als in der Hydroxylform enthalten sein.

8. Das Chitosan gibt mit Brom ein scharlachrotes Additionsprodukt, welches sein Brom bereits beim Erwärmen mit Wasser verliert.

9. Die Chitosane aus den Stützsubstanzen von Arthropoden und Mollusken sind miteinander identisch.

10. Die Tegumente der Schmetterlingspuppen bestehen nicht, wie Griffiths behauptete, aus einer durch Hydrolyse in Leucin und Kohlensäure zerfallenden Substanz, dem Pupin, sondern aus gewöhnlichem Chitin.

XII.

Über Nukleïnsäure-Eiweißverbindungen unter besonderer Berücksichtigung der Nukleïnsäure der Milchdrüse und ihrer angeblichen Beziehung zur Kaseïnbildung.

Von **Wilhelm Löbisch,**

Demonstrator am k. k. physiologischen Institut der Universität zu Wien.

Ausgeführt unter der Leitung des Privatdozenten Dr. Otto von Fürth, Assistenten am k. k. physiologischen Institut der Universität zu Wien.

Die hervorragende physiologische Bedeutung des Kaseïns läßt die Frage der Entstehung dieses für das Milchdrüsensekret charakteristischen Eiweißkörpers als ein wichtiges Problem der Biochemie erscheinen. Auch hat es nicht an Bemühungen gefehlt, diese Frage ihrer Lösung näher zu bringen, ohne daß aber die betreffenden Versuche zu einem befriedigenden Abschlusse gelangt wären und eine ausreichende Erklärung für den Vorgang der Kaseïnbildung in der Milchdrüse erbracht hätten.

Während sich Kemmerich, Dähnhardt und Thierfelder bemüht hatten, Anhaltspunkte für die Annahme einer fermentativen Bildung von Kaseïn auf Kosten der Serumeiweißkörper zu gewinnen, hat sich K. Basch [1]) in Prag, gestützt auf Untersuchungen histologischer und chemischer Art, erst kürzlich mit aller Bestimmtheit für einen Zusammenhang des Kernzerfalles in den sezernierenden Milchdrüsenzellen mit der Kaseïnbildung ausgesprochen.

---

[1]) K. Basch, Die Physiologie der Milchabsonderung, Ergebn. d. Physiologie, herausgegeben von Asher und Spiro 2, 1. Abteil., Biochemie 1903, S. 370 bis 373; vgl. dort auch eine Zusammenstellung der einschlägigen Literaturangaben. — Ferner K. Basch, Die Entstehung des Kaseïns in der Milchdrüse, Jahrb. f. Kinderheilkunde, N. F. 47, 90 (1898).

Bereits Nissen hatte auf Grund histologischer Untersuchungen den Nukleïngehalt der Milch mit dem Kernzerfalle des sezernierenden Gewebes in Zusammenhang gebracht. „Ich vermutete", sagt nun Basch, „in der Nukleïnsäure der Milchdrüse die Muttersubstanz des Kaseïns, stellte dieselbe dar und ließ sie dann in saurer Lösung auf Rinderblutserum einwirken. Ich erhielt so, wenn ich das Blutserum im Überschusse anwandte, einen Körper, der die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften wie das Kuhkaseïn darbot, die gleiche Löslichkeit und Opaleszenz mit Kalksalzen zeigte und im Brutschranke typische Labgerinnung gab, welche für das Kaseïn so charakteristisch ist, daß sie allein zur Identifizierung genügt, da sie mit Sicherheit kein anderer Eiweißkörper außer Kaseïn darbietet. Als weiteres bestätigendes Moment für die Annahme, daß das Kaseïn von den Kernen der Milchdrüsenzellen abstamme, kommt hinzu, daß die Nukleïne, die ich aus der Substanz der Milchdrüse gewinnen konnte, bei ihrer Zersetzung mit Salzsäure ebensowenig Xanthinbasen lieferten wie das Kaseïn (Pseudonukleïne) und daß sie ferner in gleicher Weise wie Kaseïn auch keine reduzierende Substanz als Merkmal einer Kohlehydratgruppe im Eiweißmolekül erkennen ließen. Ich glaube, daß es mir durch die Darstellung des Kaseïns außerhalb des Körpers gelang, auch die Entstehung des Kaseïns in der Milchdrüse insofern aufzuhellen, als es hierdurch wahrscheinlich ist, daß dasselbe dort ebenfalls nur durch einen einfachen chemischen Prozeß, ohne Zuhilfenahme eines Ferments, entsteht, indem die bei der Tätigkeit der Drüsenzelle freiwerdende Nukleïnsäure sich innerhalb des Alveolus mit dem transsudierten Serum zu einem Nukleoalbumin, dem Kaseïn, verbindet."

Eine experimentelle Prüfung dieser Hypothese erschien angesichts der großen physiologischen Bedeutung der behandelten Frage um so mehr geboten, als von vornherein gewichtige Bedenken gegen diese Auffassung geltend gemacht werden konnten. Ich habe daher auf Veranlassung des Herrn Privatdozenten Dr. O. v. Fürth eine neuerliche Bearbeitung dieses Problems in Angriff genommen und bin — wie ich vorausschickend bemerken möchte — zu einer von Basch wesentlich abweichenden Auffassung gelangt.

Anknüpfend an meine Untersuchung über die Eiweißverbindungen der Milchdrüsennukleïnsäure habe ich noch eine Reihe von Beobachtungen über die Bildungsbedingungen von Nukleïnsäure-Eiweißverbindungen im allgemeinen insbesondere von

dem Gesichtspunkte aus angestellt, um zu ermitteln, ob die Entstehung derartiger Verbindungen an das Vorhandensein und die Unversehrtheit gewisser Gruppen im Eiweißmoleküle gebunden sei und ob andererseits vom Studium derartiger künstlicher Nukleïne Aufschlüsse über gewisse Eigenschaften, insbesondere auch über die Molekulargröße von Proteïnsubstanzen erwartet werden könnten.

1. Die Nukleïnsäure der Milchdrüse.

Als eine unerläßliche Vorbedingung für die systematische Bearbeitung des eingangs erörterten Problems erschien die Erwerbung genauerer Kenntnisse über die Nukleïnsäure der Milchdrüse.

Über diese lagen zur Zeit, als die vorliegende Untersuchung in Angriff genommen wurde, noch keinerlei genauere Angaben vor. Nur das Nukleoproteïd der Milchdrüse als solches war von Odenius[1]) nach einem von Hammarsten für das Nukleoproteïd des Pankreas ausgearbeiteten Verfahren dargestellt und genauer untersucht worden.

Dieses Nukleoproteïd hatte die Zusammensetzung:

C	46,89	bis	47,15	Proz.
H	6,04	„	6,15	„
N	17,26	„	17,29	„
S	0,875	„	0,904	„
P	0,275	„	0,278	„
Asche	0,922	„	0,962	„

Es erwies sich mit dem Nukleoproteïd des Pankreas insofern übereinstimmend, als es bei der Säurespaltung reichlich Pentose und Guanin, nicht aber andere Purinbasen lieferte.

Ein Versuch zur Gewinnung der Milchdrüsennukleïnsäure als solcher war von Basch[2]) ausgeführt worden. Er erhielt nach dem Altmannschen Verfahren ein Präparat in Form eines sandigen, Lackmus rötenden Pulvers, das 4,1 bis 4,5 Proz. P und 13,4 Proz. N enthielt und dessen angesäuerte Lösung sich befähigt erwies, die Serumeiweißkörper unter Bildung eines künstlichen Nukleoalbumins zu fällen.

Ich habe es zunächst als meine Aufgabe betrachtet, die Nukleïnsäure der Milchdrüse zu isolieren und ihre Zusammensetzung sowie ihre Eigenschaften festzustellen.

Als meine darauf bezüglichen Untersuchungen bereits im

[1]) R. Odenius, Några undersökningar öfver en nukleoproteïd ur mjölkkörteln. Upsala Läkaref. Forh. (N. F.) 5. Zitiert nach dem Referate von Hammarsten im Jahresber. f. Tierchemie 30, 39.

[2]) Basch, l. c.

wesentlichen abgeschlossen waren, erschien eine denselben Gegenstand betreffende Arbeit von Mandel und Levene [1]).

Mandel und Levene extrahierten die Nukleïnsäure aus den gekochten Milchdrüsen mit Alkali und fällten sie, nach Beseitigung der Eiweißsubstanzen mittels Essigsäure und Pikrinsäure, mit Alkohol. Die Analyse eines daraus gewonnenen Kupfersalzes ergab C 31,34 Proz., H 4,07 Proz., N 14,65 Proz., P 8,48 Proz., Cu 7,00 Proz. Bei der Säurespaltung wurden Purin- und Pyrimidinbasen, sowie Lävulinsäure gewonnen. Die auf 100 g berechnete Ausbeute betrug 4,56 g Adeninpikrat, 1,05 g Guanin, 5 g Thymin und 10 g Cytosinpikrat.

Die Mitteilung meiner eigenen auf den gleichen Gegenstand bezüglichen Untersuchungen erscheint insofern gerechtfertigt, als ich mich zur Darstellung der Milchdrüsennukleïnsäure eines wesentlich anderen Verfahrens als Levene und Mandel bediente und die Beobachtungen dieser Autoren nach mehrfacher Richtung durch die meinigen ergänzt und erweitert werden.

Darstellung der Nukleïnsäure. Mit Rücksicht auf die Angaben von Odenius über die Ähnlichkeit des Nukleoproteïds der Milchdrüse mit demjenigen des Pankreas versuchte ich zunächst die Nukleïnsäure nach einem kürzlich von Bang und Raaschou [2]) für die Darstellung der Guanylsäure aus Pankreas angegebenen Verfahren zu gewinnen. Dasselbe beruht darauf, daß die Drüse durch Erwärmen mit verdünnter Natronlauge verflüssigt wird; nach Beseitigung der Hauptmenge der Eiweißkörper durch Essigsäure wird die mit Ammoniak schwach alkalisch gemachte Flüssigkeit eingeengt und mit Alkohol gefällt. Durch wiederholtes Lösen in heißem Wasser und Fällen mit Alkohol erhält man angeblich absolut eiweißfreie Nukleïnsäurepräparate. Es ergab sich aber, daß dieses Verfahren für die Milchdrüse nicht anwendbar ist. Trotz genauer Einhaltung der Vorschrift von Bang und Raaschou gelang es mir nicht, eiweißfreie Präparate zu erhalten.

Bessere Resultate ergab mir eine Kombination des Verfahrens von Levene [3]) mit demjenigen Schmiedebergs [4]).

[1]) J. A. Mandel und P. A. Levene, Darstellung und Analyse einiger Nukleïnsäuren. XI. Über die Nukleïnsäure der Kuhmilchdrüse. Zeitschr. f. physiol. Chemie 46, 155 bis 158 (Oktober 1905).

[2]) J. Bang und C. H. Raaschou, Über die Darstellung der Guanylsäure, Diese Beiträge 4, 175 (1904).

[3]) P. A. Levene, Darstellung und Analyse einiger Nukleïnsäuren, Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 540 (1901) und 37, 403 (1903).

[4]) O. Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. 43, 58 (1900).

Nach Beseitigung der Hauptmenge der Eiweißkörper mit Essigsäure und Pikrinsäure und Darstellung des Kupfersalzes der Nukleïnsäure mit Kupferchlorid erwies sich das Präparat noch nicht völlig eiweißfrei. Zur Beseitigung der Eiweißreste wurde es mit starker Kalilauge zu einem dicken Brei verrieben und dieser mit dem mehrfachen Volumen Alkohol versetzt, worauf ein dunkelblauer, teigiger Niederschlag ausfiel, während die überstehende Flüssigkeit Biuretfärbung annahm. Nach Beseitigung der letzteren und Zerlegung des Kupfersalzes mit verdünnter Salzsäure wurde die schwer lösliche Nukleïnsäure in eiweißfreiem Zustande erhalten.

Die bei weitem besten Resultate erzielte ich bei Anwendung der zur Darstellung von Nukleïnsäure aus Thymus angegebenen Methode von Neumann[1]).

Je 3 kg rein präparierten Kuheuters wurden mit essigsäurehaltigem Wasser gekocht, sodann fein zerkleinert und in 6 Liter siedenden Wassers gebracht, dem vorher 100 g Ätznatron und 600 g Natriumacetat zugesetzt worden waren. Nach halbstündigem Erhitzen auf dem Wasserbade wurde mit 450 ccm 50 prozentiger Essigsäure versetzt, durch einen Heißwassertrichter filtriert, das Filtrat auf etwa 2 Liter eingeengt und die auf 40° abgekühlte Lösung mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt. Nach völligem Absitzen der hellgefärbten Fällung wurde die überstehende Flüssigkeit abgegossen, der Niederschlag auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt und mit 50 prozentigem Alkohol gut gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Biuretreaktion mehr gab. Sodann wurde der Niederschlag vom Filter genommen und mit etwa 200 ccm Wasser so lange auf dem Wasserbade erhitzt, bis sich die Flüssigkeit unter Abscheidung eines flockigen Niederschlages geklärt hatte. Nach Beseitigung des letzteren resultierte eine beim Erkalten gelatinierende, eiweißfreie Lösung von nukleïnsaurem Natron.

Zum Zwecke der Analyse wurde dieses in folgender Weise in ein Kupfersalz übergeführt: Die Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 95 prozentigen Alkohols und etwas konzentrierter Natriumacetatlösung versetzt und mit Salzsäure gefällt. Die schneeweiße, voluminöse und zähe Nukleïnsäurefällung wurde auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt, mit Wasser chlorfrei, sodann mit Alkohol gewaschen und durch mehrtägiges Stehen unter absolutem Alkohol zum Erhärten gebracht. Sodann wurde die Substanz in

[1]) A. Neumann, Nukleïnsäuren A und B aus Thymus und Nukleothyminsäure. Arch. f. Anat. u. Physiol., Suppl. 1889, S. 552.

verdünnter Natronlauge in der Wärme gelöst, die filtrierte Lösung mit Essigsäure genau neutralisiert und mit Kupferchloridlösung versetzt, der voluminöse, gallertige, hellgrüne Niederschlag nach dem Absitzen auf ein gehärtetes Filter gebracht, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen und bei 40⁰ zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Eigenschaften der Nukleïnsäure. Die Nukleïnsäure der Milchdrüse ist schwer löslich in Wasser; dagegen sind ihre Alkalisalze leicht löslich. Mäßig konzentrierte Lösungen von nukleïnsaurem Alkali gelatinieren beim Erkalten. Die Lösungen zeigen folgendes Verhalten:

Sie sind fällbar durch Salzsäure, nicht aber durch Essigsäure. Durch dieses Verhalten erscheint die Milchdrüsennukleïnsäure von der Guanylsäure scharf unterschieden, insofern diese auch von Essigsäure aus ihren Lösungen niedergeschlagen wird und sich in einem Überschuß von verdünnter Salzsäure leicht löst.

Wird die Lösung mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, so erfolgt keine Fällung; bei weiterem Zusatze weniger Tropfen einer konzentrierten Natriumacetatlösung tritt jedoch ein reichlicher Niederschlag auf.

Kupferchlorid erzeugt einen gelatinösen, hellgrünen Niederschlag, Silbernitrat eine voluminöse, weiße Fällung, die sich beim Erwärmen mit verdünnter Salpetersäure löst.

Auf Zusatz einer Lösung von Wittepepton oder einer Eiweißlösung zu der mit Essigsäure angesäuerten Lösung entsteht ein voluminöser, in verdünnter Natronlauge sehr leicht löslicher Niederschlag (Künstliches Nukleïn s. u.).

Weder beim Schütteln der alkalisch gemachten Lösung mit Benzoylchlorid noch mit Benzolsulfochlorid kommt es zur Abscheidung eines schwerlöslichen Produktes.

Die Lösung gibt weder die Biuretreaktion, noch die Reaktion von Millon.

Wird die mit einem Tropfen alkoholischer α-Naphtollösung versetzte Flüssigkeit über konzentrierte Schwefelsäure geschichtet, so tritt eine prachtvolle Violettfärbung auf (Reaktion von Molisch). Beim Kochen mit Phloroglucin und konzentrierter Salzsäure tritt erst eine rosenrote, dann eine braunrote Färbung auf. Wird die Nukleïnsäure erst durch mehrstündiges Kochen mit verdünnter Salzsäure aufgespalten und die Flüssigkeit sodann mit Phloroglucin und konzentrierter Salzsäure gekocht, so erscheint sie granatrot, während der Schaum vorübergehend eine rosenrote Fär-

bung annimmt. Auch bei andauerndem Kochen mit verdünnter Mineralsäure gelingt es nicht, eine die Fehlingsche Flüssigkeit reduzierende Substanz abzuspalten. Doch gelang es, wie erwähnt, Levene und Mandel bei intensiver Säurewirkung Lävulinsäure zu erhalten. Dieser Befund, zusammengehalten mit der überaus intensiven Reaktion nach Molisch, stellt die Existenz eines festgebundenen Kohlehydratkomplexes im Moleküle der Milchdrüsennukleïnsäure sicher.

Wie erwähnt, haben Mandel und Levene bei der Säurespaltung der Milchdrüsennukleïnsäure Purinkörper (Guanin, Adenin) und Pyrimidinbasen (Thymin, Cytosin) erhalten. Die Abspaltung des Guanins läßt sich ohne weiteres demonstrieren, wenn man eine kleine Menge der Nukleïnsäure zwei Stunden lang mit 10 prozentiger Salzsäure am Wasserbade erhitzt und die von abgeschiedenem Melanin befreite Flüssigkeit mit Ammoniak fällt, den Niederschlag abfiltriert und in einem Schälchen mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure eindampft. Man erhält einen gelben Rückstand, der mit einigen Tropfen Natronlauge eine prachtvolle, blauviolette Färbung annimmt. Während Odenius bei Spaltung des Milchdrüsennukleoproteïds neben Guanin keine anderen Purinkörper nachzuweisen vermochte, erhielten Mandel und Levene eine bedeutend größere Ausbeute an Adenin als an Guanin. Ich möchte es nicht unterlassen, eine Beobachtung mitzuteilen, die darauf hinweist, daß bei Bestimmung des Guanins in der üblichen Weise durch einfache Ammoniakfällung leicht die tatsächlich vorhandene Guaninmenge zu gering bewertet werden kann: ein Quantum Milchdrüsennukleïnsäure wurde mit 10 prozentiger Salzsäure einige Stunden erhitzt und die Zersetzungsflüssigkeit vorsichtig mit einem Überschuß von Ammoniak gefällt. Aus dem Filtrate konnte der durch Ammoniak nicht unmittelbar fällbare Rest der Purinkörper durch Zusatz von Silbernitrat gefällt werden. Der Silberniederschlag wurde mit Salzsäure zerlegt. In dem Filtrate von Chlorsilber erzeugte nun Ammoniak neuerlich einen Niederschlag, der sich durch die Murexidreaktion als Guanin erwies. Es wurde nun der Rest der Purinkörper wieder mit Silbernitrat gefällt, der Niederschlag wiederum wie vorhin behandelt und so noch eine dritte Guaninfraktion erhalten, derart, daß ich den Eindruck gewann, daß das Guanin unter den vorhandenen Purinkörpern seiner Menge nach im Vordergrunde stehe.

Zusammensetzung der Nukleïnsäure. Die Analyse eines nach dem oben mitgeteilten Verfahren gewonnenen Präparates von nukleïnsaurem Kupfer ergab folgende Werte:

1. 0,2537 g Substanz gaben:
   0,2408 g CO_2, entsprechend 25,90 Proz. C.
   0,0818 g H_2O, „ 3,58 „ H.
2. 0,2095 g Substanz gaben:
   0,1973 g CO_2, entsprechend 25,68 Proz. C.
   0,0675 g H_2O, „ 3,58 „ H.
3. 0,3102 g Substanz gaben:
   26,4 ccm N (9,5°, 726 mm), entsprechend 9,80 Proz. N.

4. 0,1386 g Substanz gaben:
11,5 ccm N (10^0, 726 mm), entsprechend 9,52 Proz. N.
5. 0,9657 g Substanz gaben:
0,1402 g P_2O_5 (aus Trippelphosphat), entsprechend 6,33 Proz. P.
6. 1,0418 g Substanz gaben:
0,1445 g P_2O_5, entsprechend 6,05 Proz. P.
7. 1,0418 g Substanz gaben:
0,2741 g CuO, entsprechend 21,02 Proz. Cu.

C	25,90 Proz.	25,68 Proz.	Mittel 25,74 Proz.
H	3,58 „	3,58 „	„ 3,58 „
N	9,80 „	9,52 „	„ 9,66 „
P	6,33 „	6,05 „	„ 6,19 „
Cu	21,02 „	— „	„ 21,02 „
O + Asche . . .	— „	— „	„ 33,81 „
			100,00 Proz.

Daraus berechnet sich die Atomrelation:

$$C_{3,11} \quad H_{5,19} \quad N_1 \quad P_{0,29} \quad Cu_{0,98}$$

oder

$$C_{42,8} \quad H_{71,5} \quad N_{13,8} \quad P_4 \quad Cu_{6,6}.$$

Das Verhältnis N:P beträgt demnach $N_{14}:P_4$.

Wir begegnen hier sonach wiederum jener für die Nukleïnsäuren charakteristischen Relation zwischen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorgehalt, wie sie beim Studium der verschiedensten Nukleïnsäuren immer wiederkehrt (vgl. die einschlägige Literatur bei O. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 2. Aufl. 1904, S. 215), z. B.:

Nukleïnsäure der Lachsmilch (Schmiedeberg, Herlant)	$C_{40}N_{14}P_4$
„ „ Thymus (Bang)	$C_{40}N_{14}P_4$
„ „ „ (Kostytschew)	$C_{41}N_{14}P_4$
„ des Heringsspermas (Herlant)	$C_{40}N_{14}P_4$
„ der Hefe (Herlant)	$C_{36}N_{14}P_4$
„ „ „ (Miescher und Schmiedeberg)	$C_{40}N_{14}P_4$

Diesen Formeln reiht sich sowohl die aus meinen Analysen resultierende Relation $C_{43}N_{14}P_4$, als diejenige, welche sich aus der Analyse von Mandel und Levene berechnen läßt ($C_{39}N_{14}P_4$), annähernd an, während die viel stickstoffreichere Pankreasnukleïnsäure ($C_{44}N_{20}P_4$, Bang) einen anderen Typus zu repräsentieren scheint, der auch in ihren abweichenden Lösungs- und Fällungsverhältnissen deutlich zum Ausdrucke kommt.

Man ist daher berechtigt, die Milchdrüsennukleïnsäure sowohl ihren Eigenschaften, als auch ihrer Zu-

sammensetzung nach den Nukleïnsäuren vom Typus der Thymus- und Spermanukleïnsäure anzugliedern, sie dagegen der Guanylsäure gegenüberzustellen.

2. Versuche der Darstellung künstlicher Nukleïne aus der Nukleïnsäure der Milchdrüse.

Da die mitgeteilten Untersuchungen ergeben hatten, daß die Nukleïnsäure der Milchdrüse das typische Verhalten anderer im Organismus verbreiteter Nukleïnsäuren zeigt und keineswegs, wie Basch angenommen hatte, frei von Xanthinbasen und kohlehydratartigen Komplexen ist, konnte an eine Identität des aus Milchdrüsennukleïnsäure und einem Eiweißkörper des Blutserums erhaltenen Additionsproduktes mit dem Kaseïn natürlich nicht mehr gedacht werden.

Dagegen forderten die bestimmt lautenden Angaben von Basch[1]) über die Labgerinnung seines künstlichen Nukleïns zu weiteren Untersuchungen über diesen Gegenstand auf. Basch hatte durch Einwirkung seiner Milchdrüsennukleïnsäure auf einen Überschuß von Rinderblutserum ein Nukleoalbumin erhalten, das mit Calciumchlorid nur eine opaleszierende Lösung gab, die dann aber bei Zusatz von Labferment im Brutschranke typische Gerinnung zeigte. „Damit war“, sagte Basch, „jenes Merkmal des Kaseïns hergestellt, das für dasselbe als das charakteristischste gilt, weil es außer diesem kein Eiweißkörper darbietet.“

Es lag daher der Gedanke nahe, daß die Milchdrüsennukleïnsäure möglicherweise einen Komplex enthalten könnte, der, in den Molekularverband eines Eiweißkörpers eingeführt, etwa befähigt wäre, diesem die spezifische Eigenschaft der Gerinnbarkeit durch Einwirkung des Labfermentes zu erteilen.

Von diesem Gesichtspunkte ausgehend, habe ich daher ein durch Einwirkung von Milchdrüsennukleïnsäure auf Rinderblutserum erhaltenes Additionsprodukt genauer untersucht.

Künstliches Nukleïn. Frisches, mit Essigsäure angesäuertes Rinderblutserum wurde mit einer nach Neumanns Verfahren (s. o.) aus Kuheuter dargestellten Lösung von reinem nukleïnsaurem Natron versetzt, der voluminöse Niederschlag erst durch Dekantation, dann auf einem gehärteten Saugfilter mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 97° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

---

[1]) K. Basch, Die Entstehung des Kaseïns in der Milchdrüse. Jahrb. f. Kinderheilk., N. F., **47**, 90 (1898).

Die Analyse dieses Präparates ergab folgende Werte:

1. 0,2980 g Substanz gaben:
   0,5609 g CO_2, entsprechend 51,31 Proz. C.
   0,1816 g H_2O, „ 6,77 „ H.
2. 0,1189 g Substanz gaben:
   0,2224 g CO_2, entsprechend 50,96 Proz. C.
   0,0682 g H_2O, „ 6,39 „ H.
3. 0,1610 g Substanz gaben:
   20,7 ccm N (9°, 722 mm), entsprechend 14,88 Proz. N.
4. 0,2538 g Substanz gaben:
   0,0177 g $BaSO_4$, entsprechend 0,96 Proz. S.
5. 0,7136 g Substanz gaben:
   0,0350 g P_2O_5, entsprechend 2,14 Proz. P.

C	51,31	Proz.	50,96	Proz.	Mittel 51,14	Proz.
H	6,77	„	6,39	„	„ 6,58	„
N	14,88	„	—	„	„ 14,88	„
S	0,96	„	—	„	„ 0,96	„
P	2,14	„	—	„	„ 2,14	„
O	—	„	—	„	„ 24,30	„
					100,00	Proz.

Die Betrachtung der Analysenzahlen ergibt zunächst, daß dieses künstliche Nukleïn mit dem Kaseïn[1]) in seiner Zusammensetzung tatsächlich keinerlei Ähnlichkeit zeigt; es ist erheblich ärmer an Kohlenstoff und Wasserstoff, reicher an Sauerstoff und enthält mehr als doppelt soviel Phosphor als das Kaseïn.

Es ergibt sich weiterhin, daß die Nukleïnsäure bei ihrer additiven Verbindung das Serumglobulin dem Albumin gegenüber entschieden bevorzugt haben dürfte. Der im Vergleich zum Serumalbumin niedrige Schwefelgehalt des Nukleoalbumins (0,96 Proz. S) deutet darauf hin, denn das kristallisierte Serumalbumin (Gürber und Michel) enthält 1,9 Proz., das Serumglobulin (Hammarsten) nur 1,11 Proz. Schwefel.

Durch die Aufnahme der im Verhältnis zu den Serumeiweißkörpern sehr kohlenstoff- und wasserstoffarmen und sauerstoffreichen Nukleïnsäure erscheint beim Vergleiche mit den nativen Eiweißkörpern[2]) der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt des Additionsproduktes herabgedrückt, der Sauerstoffgehalt dagegen gesteigert.

[1]) Kaseïn nach Hammarsten: C 53,0 Proz., H 7,0 Proz., S 0,8 Proz., P 0,85 Proz., O 22,65 Proz.

[2]) Kristallisiertes Serumalbumin (Gürber und Michel): C 53,08 Proz., H 7,1 Proz., N 15,93 Proz., S 1,9 Proz., O 21,99 Proz. Serumglobulin (Hammarsten): C 52,71 Proz., H 7,01 Proz., N 15,85 Proz., S 1,11 Proz., O 23,32 Proz.

Labungsversuche. Zur Nachprüfung der Angaben von Basch über das Vermögen des aus Milchdrüsennukleïnsäure und Rinderblutserum erhaltenen Additionsproduktes, der Labgerinnung zu unterliegen, habe ich ein wie oben dargestelltes Präparat in noch feuchtem Zustande in $^1/_{10}$-Normal-Salzsäure sorgfältig bis zur Grenze der eben beginnenden Fällung zurückneutralisiert. Proben dieser Lösung wurden mit und ohne Zusatz von Calciumchlorid der Einwirkung eines äußerst wirksamen Präparates von Labferment im Brutschranke unterworfen. Der Kalkzusatz wurde mit Rücksicht auf die Angaben von Lörcher[1]), denen zufolge Calciumchlorid in schwächeren Konzentrationen (0,1 bis 2 Proz.) die Labgerinnung fördert, in größeren (von 5 Proz. aufwärts) aber hemmt, mit $^1/_2$ ccm 2 prozentiger Calciumchloridlösung bemessen.

Ich bemerkte in keiner Probe irgend eine Gerinnungserscheinung, vermochte mich sonach nicht davon zu überzeugen, daß das aus Milchdrüsennukleïnsäure und Rinderblutserum erhaltene Additionsprodukt in ähnlicher Weise, wie das Kaseïn, die Eigentümlichkeit der Labgerinnung aufweist.

Ich möchte zur Erklärung dieses Widerspruches mit den Angaben von Basch auf folgendes hinweisen: Es war seinerzeit sicherlich durchaus gerechtfertigt, wenn Basch die Erscheinung eines durch Labferment eingeleiteten Gerinnungsvorganges für eine spezifische Eigentümlichkeit des Kaseïns hielt. Seit der ersten Veröffentlichung seiner Erfahrungen über diesen Gegenstand (1898) sind nun aber zahlreiche Beobachtungen bekannt geworden, aus denen hervorgeht, daß manche Eiweißderivate (Albumosen u. dgl.) unter der Einwirkung des Labfermentes Gerinnungserscheinungen zeigen (Plasteïnbildung). Ein Vorgang dieser oder ähnlicher Art könnte nun vielleicht bei den vorerwähnten Beobachtungen von Basch mit im Spiele gewesen sein.

Auch ist Basch vollkommen im Rechte, wenn er angibt, daß die aus der Substanz der Milchdrüse gewonnenen Nukleïne, ebenso wie das Kaseïn, keine abspaltbare reduzierende Substanz erkennen ließen. Die Gegenwart eines fest gebundenen Kohlehydratkomplexes in der Milchdrüsennukleïnsäure verrät sich aber durch die äußerst intensive Reaktion von Molisch und durch die bei tiefgreifender Spaltung auftretende Lävulinsäure. Das Kaseïn gibt dagegen Molischs Reaktion nur äußerst schwach[2]), derart, daß dieselbe, soweit sie überhaupt nachweisbar ist, wohl auf die Gegenwart von Verunreinigungen bezogen werden darf.

Was endlich die Annahme betrifft, daß die eiweißfällende Nukleïnsäure der Milchdrüse frei von Xanthinbasen sei, so findet dieselbe in einer Verallgemeinerung einer Beobachtung ihre Erklärung. „Es gelang mir“, sagt Basch, „aus dem für die Nukleïnsäure erschöpften Drüsenpulver ein

[1]) Lörcher, Pflügers Archiv 69, 151.

[2]) Vgl. Alexander, Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 411.

weiteres Nukleïn der Milchdrüse dadurch herzustellen, daß ich das nach der Nukleïnsäuredarstellung restierende Material nochmals in Lauge löste und sodann den mit Essigsäure ausfallenden Körper gesondert darstellte... Das so erhaltene Nukleïn der Milchdrüse, das mit der Nukleïnsäure nahe verwandt sein muß und wahrscheinlich das Reproduktionsmaterial für dieselbe im Zellkerne abgeben dürfte, hatte genau denselben Phosphorgehalt (2,5 Proz.) wie die Nukleïnsäure . . . Dieses, der Nukleïnsäure nahestehende Nukleïn der Milchdrüse stimmte mit dem Kaseïn auch nach der Richtung überein, daß es, ebensowenig wie Kaseïn, bei Zersetzung mit Säuren Xanthinbasen liefert." Tatsächlich hat aber Basch hier ein Nukleoalbumin in Händen gehabt, das sicherlich von der Nukleïnsäure der Milchdrüse (diese enthält in reinem Zustande etwa 9 Proz. Phosphor) grundverschieden war. Den Versuch, aus dieser letzteren durch Säureabspaltung Xanthinbasen zu gewinnen, scheint Basch nicht ausgeführt zu haben.

Thyminsäure. Den Angaben von Kossel und Neumann[1]) zufolge ist die Thymusnukleïnsäure im freien Zustande sehr labil und geht bereits bei kurz dauerndem Erwärmen ihrer wässerigen Lösung unter Abspaltung der Nukleïnbasen in die phosphorhaltige „Thyminsäure" über, ohne dabei ihre eiweißfällenden Eigenschaften einzubüßen.

Ich legte mir nun die Frage vor, ob die Milchdrüsennukleïnsäure einer analogen Umwandlung fähig sei und ob nicht die Möglichkeit bestehe, daß die beim Zerfall der Kerne der sezernierenden Milchdrüsenzellen entstandene Nukleïnsäure etwa durch Fermentwirkung ihre Nukleïnbasen und vielleicht auch ihre Kohlehydratgruppe einbüße, worauf sich dann der phosphorhaltige Rest, die „Thyminsäure", mit einem Eiweißkörper des Blutserums (oder einem Derivate eines solchen) unmittelbar zu Kaseïn vereinigen könnte.

Ich habe nun, um auch diese Möglichkeit zu prüfen, dem Vorgange von Kossel und Neumann folgend, aus einer Lösung des reinen Natronsalzes der Milchdrüsennukleïnsäure diese durch Salzsäure in Freiheit gesetzt und auf einem gehärteten Saugfilter chlorfrei gewaschen. Dann wurde der Niederschlag in heißem Wasser gelöst und die Lösung im kochenden Wasserbade erhitzt. Eine nach sieben Minuten entnommene Probe gab auf Salzsäurezusatz noch eine Trübung, eine nach zwölf Minuten entnommene Probe jedoch nicht mehr. Auch ein Überschuß von Barytwasser erzeugte keine Trübung; es hatte sonach keine Abspaltung anorganischer Phosphorsäure stattgefunden.

Die Lösung dieser „Thyminsäure" zeigte saure Reaktion, war weder durch Alkohol, noch durch Ammoniak oder ammoniakalische

[1]) Kossel und Neumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie 22, 74.

Silberlösung fällbar; Phosphorwolframsäure gab einen im Überschuß des Reagens sehr leicht löslichen Niederschlag.

Die mit Essigsäure angesäuerte Lösung war, ebenso wie die Nukleïnsäure, befähigt, Rinderblutserum zu fällen. Die Lösung eines solchen Niederschlages wurde ganz analog, wie das aus Nukleïnsäure und Blutserum erhaltene künstliche Nukleïn, auf die Fähigkeit, mit Labferment zu gerinnen, geprüft. Doch auch hier fiel der Versuch negativ aus.

Die Prüfung eines nach Barytwasserzusatz mit Alkohol abgeschiedenen Barytsalzes ergab, daß die Thyminsäure noch die Reaktion von Molisch gibt, also sicherlich noch den Kohlehydratkomplex der Nukleïnsäure enthält. Auch muß es nach den Angaben von Schmiedeberg[1]) und Alsberg[2]) über die Nukleotinphosphorsäure fraglich erscheinen, ob diese Thyminsäure wirklich gänzlich frei von Purinbasen war.

Keinesfalls aber ist das aus der Thyminsäure der Milchdrüse und aus Rinderblutserum erhaltene künstliche Nukleïn mit dem Kaseïn identisch.

Die Hypothese einer einfachen und unmittelbaren Beziehung der in den Zellkernen der Milchdrüse enthaltenen Nukleïnsäure als solcher zur Kaseïnbildung erscheint sonach durch die mitgeteilten Versuche widerlegt. Damit soll aber natürlich nicht die Möglichkeit geleugnet werden, daß die beim tiefgehenden Zerfall der Nukleïnsäure auftretenden phosphorhaltigen Komplexe beim Aufbau des Kaseïns wesentlich beteiligt sein könnten.

3. Versuche über die Art der Anlagerung von Nukleïnsäuren an Eiweißkörper im allgemeinen.

Seitdem Altmann[3]) auf die Eigenschaft der Nukleïnsäuren, mit Eiweißkörpern schwer lösliche Verbindungen einzugehen, hingewiesen hatte, war von der Analogie der natürlich vorkommenden Nukleïne mit derartigen künstlichen Nukleïnsäure-Eiweiß-Additionsprodukten viel die Rede. Systematische Untersuchungen über die chemische Beschaffenheit derartiger Verbindungen scheinen aber nur von Milroy[4]) unter Kossels Leitung ausgeführt worden zu sein.

---

[1]) O. Schmiedeberg, Arch. f. exp. Pathol. **43**, 58 (1900).
[2]) C. L. Alsberg, Ebenda **61**, 239.
[3]) Altmann, Arch. f. Anat. u. Physiol., Abt. 1889, S. 524.
[4]) T. H. Milroy, Über die Eiweißverbindungen der Nukleïnsäure und Thyminsäure und ihre Beziehung zu den Nukleïnen und Paranukleïnen (aus dem physiol. Inst. zu Marburg), Zeitschr. f. physiol. Chemie **22**, 307.

Milroy bestimmte den Phosphorgehalt einiger derartiger Nukleïne. In einem Syntoninnukleïn fand er 3,49 Proz. P, in Deuteroalbumose-Nukleïnen 5,04 bis 6,32 Proz. P, in Wittepepton-Nukleïn 3,53 Proz. P, in thyminsaurem Syntonin 2,35 bis 3,01 Proz. P. Milroy studierte ferner die Einwirkung von Pepsin und Trypsin auf künstliche Nukleïne, insbesondere in bezug auf den Phosphorgehalt der resultierenden Verbindungen.

1. Serumeiweißkörper. Was nun die Art der Anlagerung von Nukleïnsäuren an Eiweißkörper betrifft, ergibt die Betrachtung der (im vorigen Kapitel mitgeteilten) Analysenzahlen eines aus Milchdrüsennukleïnsäure und Serumeiweiß erhaltenen Additionsproduktes folgendes:

In diesem künstlichen Nukleïn kommen auf je ein Atom Schwefel rund zwei Atome Phosphor. Da die Minimalformeln der Nukleïnsäure vier Atome Phosphor enthalten, entspricht sonach je zwei Schwefelatomen ein Molekül aufgenommener Nukleïnsäure. Infolge der Anlagerung des phosphorfreien Eiweißkörpers an die Nukleïnsäure weist das Additionsprodukt einen 4- bis $4^1/_2$ mal geringeren Phosphorgehalt auf als die Nukleïnsäure. Eine einfache Rechnung (unter Zugrundelegung der Annahme, daß das Molekulargewicht der Milchdrüsennukleïnsäure annähernd den Minimalformeln der Thymus- oder Spermanukleïnsäuren entspreche und 1200 bis 1300 betrage) ergibt, daß sich je ein Nukleïnsäuremolekül an einen Eiweißkomplex von der Molekulargrößenordnung 4000 anlagere. Auf anderen Wegen gemachte Erfahrungen, so namentlich auch die Beobachtungen von F. Hofmeister[1]) und Kurajeff[2]) an jodierten Eiweißkörpern weisen aber darauf hin, daß das tatsächliche Molekulargewicht der Serumeiweißkörper möglicherweise einem Multiplum dieser Zahl entspreche. In diesem Falle müsse man natürlich annehmen, daß ein Eiweißmolekül mehrere Moleküle Nukleïnsäure zu addieren vermöge. Ich möchte hier aber auch darauf hinweisen, daß nach Steudels[3]) neuesten Beobachtungen das wirkliche Molekulargewicht der Nukleïnsäuren möglicherweise einem Mehrfachen der bisher angenommenen Werte entspricht.

2. Leim. Es wurde weiterhin, um ein anderes künstliches Nukleïn von den gleichen Gesichtspunkten aus zu untersuchen,

[1]) F. Hofmeister, Über jodiertes Eieralbumin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 258.

[2]) Kurajeff, Über die Einführung von Jod in das kristallisierte Serum- und Eieralbumin, Ebenda 26, 462.

[3]) Steudel, Zur Kentnis der Thymusnukleïnsäure, Ebenda 46, 335, November 1905.

eine mit Essigsäure angesäuerte Lösung von reinster käuflicher Gelatine mit Milchdrüsennukleïnsäure gefällt und in dem sorgfältig ausgewaschenen und getrockneten Additionsprodukte der Phosphorgehalt bestimmt. 0,3410 g der Substanz gaben 0,0346 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 2,83 Proz. Phosphor. Der Schwefelgehalt der Substanz war so gering, daß eine genaue Bestimmung nicht möglich war. Aus dem Phosphorgehalt ergibt sich für je ein Molekül Nukleïnsäure ein Äquivalent von rund 3000. Nimmt man mit C. Th. Mörner[1]) an, daß der sehr niedrige Schwefelgehalt (0,2 Proz.) seiner Leimpräparate wirklich der Gelatine als solcher und nicht einer Verunreinigung angehörte, so muß man dem Moleküle des Leims eine außerordentliche Dimension und die Fähigkeit zuschreiben, eine größere Anzahl von Nukleïnsäuremolekülen gleichzeitig aufzunehmen.

3. Albumosen und Peptone. Um ähnliche Betrachtungen auch auf Eiweißkörper von geringerem Molekulargewicht auszudehnen, habe ich aus Wittepepton nach Ernst P. Picks[2]) fraktioniertem Fällungsverfahren mit Ammonsulfat die Deuteroalbumosen A, B, C und die alkohollösliche Peptonfraktion dargestellt und die mit Essigsäure angesäuerten 5 prozentigen Lösungen mit einer nach Neumanns Verfahren aus Kalbsthymus gewonnenen konzentrierten Lösung von reinem nukleïnsaurem Natron zu fällen versucht. Es gab jedoch nur die Deuteroalbumose A einen in großen, zähen Flocken ausfallenden Niederschlag; die Deuteroalbumose B und C gaben nur Trübungen; die Lösung des Peptons blieb ganz klar.

Das aus der Deuteroalbumose A erhaltene Additionsprodukt wurde sorgfältig gewaschen, getrocknet und analysiert. 0,3654 g davon gaben 0,0213 g $BaSO_4$ und 0,0690 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,79 Proz. Schwefel und 5,27 Proz. Phosphor (s. o. Milroys Analysen). Unter Zugrundelegung der von Kostytschew[3]) für die Thymusnukleïnsäure aufgestellten Minimalformel $C_{41}H_{74}N_{14}O_{20}P_4$ ergibt sich das einem Nukleïnsäuremolekül entsprechende Albumosenäquivalent mit 980. Der Schwefelgehalt erfordert eine Verdoppelung desselben, um zum Minimalwert des Molekulargewichtes der Albumose zu gelangen, welcher also rund auf 2000 zu schätzen

[1]) C. Th. Mörner, Beitrag zur Kenntnis einiger Eigenschaften des Glutins, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 475.

[2]) Ernst P. Pick, Untersuchungen über Proteïnstoffe, Ebenda 24, 246 (1897).

[3]) S. Kostytschew, Über Thymonukleïnsäure, Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 545 (1903).

ist. Durch Anlagerung von 2 Mol. Nukleïnsäure gelangt man dann zu einem künstlichen Nukleïn, dessen Molekulargröße von mehr als 4000 den niedrigen Schwefelgehalt unter der Annahme, daß die Albumose nur ein Schwefelatom im Molekül enthält, ausreichend erklärt.

4. Denaturierte Eiweißkörper. Endlich habe ich eine Versuchsreihe mit „denaturierten" Eiweißkörpern ausgeführt, um festzustellen, durch welche Art von Eingriffen das Vermögen der Proteïnsubstanzen, Nukleïnsäure zu binden, verloren geht. Es ergab sich dabei folgendes:

Eine Lösung von Eieralbumin, durch kurzdauerndes Erwärmen mit Formaldehyd ungerinnbar gemacht (Aldehydeiweiß), erwies sich durch Nukleïnsäure noch fällbar.

Ebensowenig büßen Eiweißkörper selbst durch sehr weitgehende Oxydation ihre Fällbarkeit durch Nukleïnsäure ein. Lösungen von Peroxyprotsäure und Kyroprotsäure (durch weitgehende Oxydation von Kaseïn mit Permanganat gewonnen), die mir von Herrn Dr. v. Fürth[1]) zur Verfügung gestellt worden waren, gaben, mit Essigsäure angesäuert, auf Nukleïnsäurezusatz reichliche Niederschläge.

Wurde dagegen eine Lösung von Leim oder Albumose A mit etwas Kaliumnitrit und Essigsäure versetzt und aufgekocht, wobei Desamidoalbumine[2]) entstehen, so ging die Fällbarkeit durch Nukleïnsäure verloren. (Daß nicht die Gegenwart des Salzes als solchen, sondern die Wirkung der naszierenden salpetrigen Säure dieses Verhalten bedingt, geht aus dem Umstande hervor, daß weiterer Zusatz der intakten Eiweißkörper zu der abgekühlten Reaktionsflüssigkeit ohne weiteres die Fällung auftreten ließ.)

Wurde die Leim- oder Albumoselösung mit dem gleichen Volumen 10prozentiger Natronlauge eine Minute lang gekocht, wobei reichlich Ammoniak entwich, und sodann mit Essigsäure angesäuert, so war das Fällungsvermögen durch Nukleïnsäure verloren gegangen.

Das gleiche war der Fall, wenn die Leimlösung fünf Minuten mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure gekocht, sodann mit Natronlauge neutralisiert und mit Essigsäure wieder angesäuert worden war.

[1]) O. v. Fürth, Beiträge zur Kenntnis des oxydativen Abbaues der Eiweißkörper. Diese Beiträge 6, 296 (1905).

[2]) S. Levites, Über Desamidoalbumine, Zeitschr f. physiol. Chemie 43, 202 (1904).

Welche Folgerungen lassen sich nun aus diesen Beobachtungen ziehen? Es ergibt sich folgendes:

Die Fällbarkeit der Eiweißkörper durch Nukleïnsäuren ist nicht an die basischen Komplexe (Arginin, Histidin, Lysin) als solche geknüpft. Denn die Kyroprotsäure, die derartige Komplexe nicht mehr im intakten Zustande enthält (v. Fürth[1]), wird noch gefällt, während Peptone, welche reichlich derartige Komplexe einschließen (Siegfried[2]), nicht niedergeschlagen werden. Daß die Reaktion nicht etwa durch das Histidin oder Lysin bedingt werde, geht übrigens schon aus dem Umstande hervor, daß die Protamine des Lachs- und Heringsspermas, die ja natürlich fähig sind, sich mit Nukleïnsäure zu verbinden, nach Kossel und Kutscher[3]) frei von Histidin und Lysin sind.

Daß die Benzolderivate des Eiweißmoleküls nicht etwa für die Reaktion verantwortlich gemacht werden dürfen, geht aus dem Umstande hervor, daß im Glutin Tyrosin und Tryptophan[4]), in der Kyroprotsäure auch das Phenylalanin fehlt und beide Eiweißkörper dennoch von Nukleïnsäure gefällt werden. Dagegen enthält zum mindesten das Glutin sicherlich noch Pyrrolidin- und Oxypyrrolidincarbonsäure.

Da aber eine kurzdauernde Einwirkung kochender Salzsäure bereits genügt, um die Reaktion zum Verschwinden zu bringen, kann überhaupt keiner der bei tiefgreifender Säurespaltung auftretenden Elementarkomplexe des Eiweißmoleküls als solcher für die Reaktion verantwortlich gemacht werden.

Auch darf man die Nukleïnsäure nicht etwa den typischen Alkaloidfällungsmitteln in bezug auf ihr Fällungsvermögen gleichstellen. Werden doch Peptone von Phosphorwolframsäure, nicht aber von Nukleïnsäure gefällt; andererseits wird Kyroprotsäure von der letzteren in typischer Weise gefällt, während der mit Phosphorwolframsäure erhältliche Niederschlag in verdünnter Salzsäure leicht löslich ist.

Auf Grund der bekannten Hypothese Liebermanns über die Beteiligung der Metaphosphorsäure am Aufbau der Nukleïne könnte man vielleicht eine weitgehende Übereinstimmung ihres

---

[1]) O. v. Fürth, l. c.

[2]) M. Siegfried, F. Müller, C. Borkel, Über Peptone usw., Zeitschr. f. physiol. Chemie 38, 258 ff. (1903).

[3]) A. Kossel und F. Kutscher, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 207.

[4]) Vgl. O. Cohnheim, Chemie d. Eiweißkörper, 2. Aufl., S. 43.

Fällungsvermögens mit demjenigen der Nukleïnsäure erwarten. Eine gewisse Analogie scheint auch wirklich vorzuliegen. So ist nach E. Fulds[1]) im Laboratorium F. Hofmeisters angestellten Versuchen die Metaphosphorsäure befähigt, die Deuteroalbumose A, nicht aber die Albumose B und Peptone zu fällen. Ein Unterschied offenbart sich aber im Verhalten gegen Kyroprotsäure, welche von Metaphosphorsäure nicht gefällt wird.

Man könnte sich nun versucht fühlen, eine besondere Qualität der Stickstoffverbindung mit der Aufnahmsfähigkeit gegenüber Nukleïnsäure in Zusammenhang zu bringen. Aus dem Formaldehydversuch ergibt sich, daß die Nukleïnsäure keinesfalls die durch das Aldehyd gerade gedeckten Aminogruppen für sich in Anspruch nimmt und der Umstand, daß kurzdauernde Alkalieinwirkung die Reaktion zum Verschwinden bringt, lenkt die Aufmerksamkeit zunächst auf den locker gebundenen Säureamid-Stickstoff. Doch auch diese Vermutung vermag der Kritik nicht standzuhalten, da gerade die von der Natur zur Nukleïnsäureaufnahme vorgebildeten Protamine nach den Versuchen von Kossel und Kutscher[2]) bei der Spaltung gar kein Ammoniak liefern.

Man gelangt demnach zur Schlußfolgerung, daß weder einer der Elementarkomplexe des Proteïnmoleküls, noch einer der angeführten Faktoren, sondern eine besondere Art von Atomverkettung die Eiweißkörper zur Aufnahme der Nukleïnsäuren befähigt. Ein eingehenderes Studium der einschlägigen Fragen könnte sich vielleicht für gewisse Probleme der Eiweißchemie förderlich erweisen.

4. Zusammenfassung.

Die wesentlichsten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen sich etwa folgendermaßen zusammenfassen:

1. Entgegen den Angaben, denen zufolge die Milchdrüsennukleïne weder Xanthinbasen noch Kohlehydratkomplexe enthalten, erwies sich die Nukleïnsäure der Milchdrüse als in dieser Hinsicht mit anderen Nukleïnsäuren des Tierkörpers übereinstimmend.

2. Die Nukleïnsäure der Milchdrüse steht in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften den Säuren vom Typus der Thymus- und Spermanukleïnsäuren, nicht aber der Guanylsäure nahe.

[1]) E. Fuld, Über die Verbindungen von Eiweißkörpern mit Metaphosphorsäure, Hofmeisters Beitr. 6, 162. Vgl. auch dort die einschlägigen Literaturangaben.

[2]) Kossel und Kutscher, l. c.

3. Die Hypothese einer Kaseïnbildung durch einfache Anlagerung der beim Kernzerfall der sezernierenden Milchdrüsenzellen entstehenden Nukleïnsäure oder ihres nächsten Spaltungsproduktes, der Thyminsäure, an Eiweißkörper des Blutserums erwies sich als unhaltbar.

4. Bei der Anlagerung von Nukleïnsäure an Serumeiweißkörper entspricht je einem Nukleïnsäuremolekül ein Äquivalentgewicht von rund 4000, beim Leim ein solches von 3000. Das Molekül der Deuteroalbumose A aus Fibrin besitzt (vorausgesetzt, daß es nur ein Schwefelatom einschließt) eine Größe von annähernd 2000 und vermag sich mit zwei Nukleïnsäuremolekülen zu verbinden. Den Deuteroalbumosen B und C und den Peptonen geht die Fähigkeit künstlicher Nukleïnbildung ab.

5. Die Fähigkeit der Eiweißkörper, Nukleïnsäure aufzunehmen, ist weder an einen der bei der tiefgreifenden Säurespaltung auftretenden Elementarkomplexe, noch an eine der typischen Stickstoffbindungsformen (Aminosäuren-, Säureamid- und Basenstickstoff) ausschließlich geknüpft und keinesfalls der Reaktion mit Metaphosphorsäure oder sogenannten Alkaloidfällungsmitteln gleich zu setzen; sie geht bereits bei kurzdauernder Salzsäure- oder Alkaliwirkung, sowie durch salpetrige Säure, nicht aber durch Aldehydeinwirkung, und ebensowenig durch tiefgreifende Oxydation verloren und muß auf eine besondere Art der Atomverkettung im Eiweißmolekül zurückgeführt werden.

Schließlich sei es mir gestattet, an dieser Stelle Herrn Hofrat Prof. Dr. Sigmund Exner für die gütige Bewilligung der Institutsmittel zum Zwecke der Ausführung meiner Arbeit und Herrn Privatdozenten Dr. Otto v. Fürth für seine Anleitung bestens zu danken.

XIII.

Über den postmortalen Glykogenschwund in den Muskeln und seine Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen.

Von Dr. med. **Franz Kisch.**

Ausgeführt unter Leitung des Privatdozenten Dr. Otto von Fürth, Assistenten am k. k. physiologischen Institut der Universität zu Wien.

Während die Literatur über die Ablagerung und den Schwund des Glykogens im lebenden Muskel in den letzten Dezennien einen außerordentlich großen Umfang angenommen hat, sind die Erscheinungen des postmortalen Glykogenschwundes bisher nur in sehr unzureichender Weise untersucht worden. Es ist dies insofern auffallend, als viele Momente dafür sprechen, daß der postmortale Glykogenschwund gewissermaßen als eine Fortsetzung des vitalen betrachtet werden darf.

Von dem Gesichtspunkte ausgehend, daß eine genaue Kenntnis des Glykogenschwundes, der sich in den Muskeln nach dem Tode vollzieht, auch der Erkenntnis jener Vorgänge zugute kommen dürfte, welche eine Mobilisierung der Kohlehydratvorräte während des Lebens und eine Regelung des Zuckerverbrauches im Organismus bedingen, bin ich daran gegangen, die Frage des postmortalen Glykogenschwundes in den Muskeln neuerlich zu bearbeiten, und zwar habe ich speziell die Abhängigkeit desselben von einer Reihe physiologischer Bedingungen zum Gegenstande meiner Untersuchungen gemacht.

1.

Bei Durchsicht der Arbeiten, welche das Verhalten des Glykogens der Muskeln zum Gegenstande haben, fällt eine starke Divergenz der den postmortalen Muskelglykogenschwund betreffenden

Angaben auf. A. Takácz[1]) kam auf Grund seiner an Kaninchen vorgenommenen Versuche zu dem Schlusse, daß das Glykogen in den Muskeln nach dem Tode sehr schnell abnehme; schon eine Zeitdifferenz von nur 15 Minuten lasse eine merkliche Verminderung des Glykogengehaltes erkennen, und 30 Minuten post mortem sei überhaupt keine Spur von Glykogen mehr vorhanden. Derselbe Autor stellte auch Untersuchungen an Tieren an, die mit Schwefelwasserstoffgas vergiftet worden waren, und gelangte dabei zu dem Resultate, daß das Muskelglykogen nicht umgewandelt werde, wenn dem Blute der Sauerstoff mangle. W. Praussnitz[2]) verwendete alte Hennen zu seinen Bestimmungen; er schnitt entsprechende Muskelpartien beider Seiten heraus; die der einen Seite prüfte er sofort auf ihren Glykogengehalt, die der anderen Seite nach 30 bis 60 Minuten (bei 18° C) und fand eine Glykogenabnahme von 25,45 bis 58,89 Proz. während des angegebenen Zeitraumes. Auch E. Voit[3]) neigte sich der Ansicht zu, daß das Muskelglykogen eine rasche Umwandlung erfahre, sobald der Muskel vom Körper losgetrennt sei. Ebenfalls der Meinung, daß eine schnelle postmortale Zersetzung des Muskelglykogens erfolge, war B. Demant[4]), welcher dieselbe auf Rechnung eines beim Tode des Muskels entstehenden Fermentes setzte. Diese Ansicht stützte der Autor durch Versuche, in welchen er die Hinterläufe durch Nackenhieb getöteter Kaninchen mit einer Lösung von 1 Proz. Phenol und 1 Proz. Kochsalz von der Bauchaorta aus durchspülte; die betreffenden Muskeln zeigten dann einen im Laufe vieler Stunden unveränderten Glykogengehalt; die Glykogenzersetzung war demnach bei Durchspülung der Muskeln mit phenolhaltiger Kochsalzlösung nach dem Tode fast gänzlich aufgehoben. A. Cramer[5]) stellte an Hunden und Kaninchen fest, daß eine Temperatur von 40° C in vierstündiger Einwirkung den Glykogengehalt vom Körper getrennter Muskeln ganz bedeutend herabzusetzen vermöge. Eine Anzahl von einschlägigen Bestimmungen

[1]) A. Takácz, Beitrag zur Lehre von der Oxydation im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 372 (1878/79).

[2]) W. Praussnitz, Über den zeitlichen Ablauf der Ablagerung und des Schwindens des Glykogens. Zeitschr. f. Biol. 26, 377 (1890).

[3]) E. Voit, Die Glykogenbildung aus Kohlehydraten. Zeitschr. f. Biologie 25, 543 (1889).

[4]) B. Demant, Beitrag zur Lehre über die Zersetzung des Glykogens in den Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 200 (1879).

[5]) A. Cramer, Beiträge zur Kenntnis des Glykogens. Zeitschr. f. Biol. 24, 66—104 (1888).

machte auch J. Seegen[1]); er verwendete Hunde- und Pferdefleisch mit und ohne Zusatz arteriellen Blutes als Versuchsmaterial und beobachtete eine erhebliche Abnahme des Glykogengehaltes der Muskulatur nach dem Tode. Seegen meinte, daß die Umwandlung des Glykogens in Zucker nicht durch das Eintreten der Starre bedingt sei, da dieser Umwandlungsprozeß auch dann noch fortdauere, wenn der Höhepunkt der Starre schon längst überschritten sei. Die Frage, ob bei der Totenstarre eine Abnahme des Glykogengehaltes im Muskel stattfinde, suchte M. Werther[2]) unter Röhmanns Leitung durch eine große Reihe von Versuchen an Kalt- und Warmblütern zu lösen; sowohl bei Fröschen wie bei Kaninchen und Katzen stellte Werther einen deutlichen Schwund des Muskelglykogens fest und erbrachte den Beweis, daß die Verminderung des Muskelglykogens bei der Totenstarre gewiß nicht durch Fäulnis bedingt sein könne, da er die Muskulatur unter aseptischen Kautelen steril abpräpariert und da sich überdies bei Prüfung der Muskelgewebsstücke auf Nährgelatine nach drei Tagen noch keine Spur von Pilzwucherung um die Gewebsstücke gezeigt hatte. Nach Boruttau[3]) beträgt der Glykogenschwund der Körpermuskeln in 24 bis 38 Stunden etwa 0,2 bis 11,1 Proz.; weit schneller vermindert sich nach Angabe dieses Autors der Glykogengehalt der Herzmuskeln unter gleichen Bedingungen, nämlich in der Zeit von 24 bis 36 Stunden um 23,9 bis 100,0 Proz. In einer Arbeit von Morat und Dufourt[4]) finden sich gleichfalls Belege für die Annahme eines postmortalen Glykogenabbaus im Muskel.

Während die bisher zitierten Arbeiten durchwegs in dem einen Punkte übereinstimmen, daß der Muskel nach dem Tode eine Verringerung seines Glykogengehaltes erfahre, wenn auch die Meinungen über die Schnelligkeit und Größe, sowie auch die Art der Glykogenzersetzung geteilt sind, sprach sich in Widerspruch mit diesen Ergebnissen R. Böhm[5]) auf Grund seiner Versuche dahin aus, daß die Totenstarre allein keine Herabminderung

---

[1]) J. Seegen, Über die Einwirkung von Muskeln und Blut auf Glykogen. Centralbl. f. med. Wissensch., 1887, Nr. 20 u. 21.

[2]) M. Werther, Über die Milchsäurebildung und den Glykogenverbrauch im quergestreiften Muskel usw. Pflügers Arch. 47, 63 (1890).

[3]) Boruttau, Vergleichende Untersuchungen über den Chemismus im Herz- und Körpermuskel. Zeitschr. f. physiol. Chemie 18, 513 (1894).

[4]) Morat und Dufourt, Sur la consommation du glycogène des muscles pendant l'activité de ces organes. Arch. de physiolog. 24, 457—463 (1893).

[5]) R. Böhm, Über das Verhalten des Glykogens und der Milchsäure im Muskelfleisch usw. Pflügers Arch. 23, 44 (1880).

des Glykogens bewirke, wohl aber eine solche dann statthabe, wenn Fäulnis eingetreten sei; noch nach 6 bis 24 Stunden konnte er an Muskeln, bei denen der Eintritt der Fäulnis verhindert worden war, keine Abnahme des Glykogengehaltes wahrnehmen. E. Külz[1]) konnte der Ansicht von Takácz, daß das Glykogen in den Muskeln nach dem Tode sich rasch vermindere und nach 30 Minuten sogar schon gänzlich verschwunden sein solle, nicht beistimmen; ein Versuch — an Winterfröschen angestellt — ergab nach 24 Stunden bloß eine Differenz von 0,0121 g im Glykogengehalt, ein anderer — an einem mit Brot und Rohrzucker gefütterten Hunde vorgenommen — eine solche von 0,0265 g (nach 30 Minuten), und ein dritter, zu welchem eine trächtige Hündin das Muskelgewebe lieferte, eine Differenz von 0,2242 g Glykogen in etwa 24 Stunden.

2. Arbeitsplan und Methodik.

Zunächst wurde festgestellt, daß der Muskel nicht nur das in ihm enthaltene Glykogen post mortem verzuckert, sondern noch außerdem erhebliche ihm zugesetzte Glykogenmengen hydrolytisch zu spalten vermag.

Um nun den Einfluß der sehr großen Schwankungen im Glykogengehalt der Muskeln auszuschalten und einen wirklich brauchbaren Maßstab für deren glykogenspaltendes Vermögen zu gewinnen, ging ich bei der Mehrzahl meiner Versuche derart vor, daß ich zu dem Muskelbrei von vornherein einen großen Überschuß von Glykogen hinzufügte und nun feststellte, wieviel davon der Muskel in einer bekannten Zeit und bei einer bestimmten Temperatur zu spalten vermag. Nur durch diesen Vorgang wurde es möglich, die bei verschiedenen Versuchen erhaltenen Werte, welche auf je 100 g Muskulatur und 1 Stunde Versuchsdauer umgerechnet wurden, miteinander vergleichbar zu machen.

Trotzdem angesichts der wenige Stunden selten überschreitenden Versuchsdauer (zumindest dort, wo bei Zimmertemperatur gearbeitet wurde) eine Trübung der Versuchsergebnisse durch die Wirkung von Mikroorganismen kaum zu befürchten war, habe ich es niemals unterlassen, durch Zusatz von Toluol zur Suspension der zerkleinerten Muskeln und ausgiebiges Schütteln diese Fehlerquelle auszuschließen.

Da aus zahlreichen Versuchen hervorgeht, wie verschieden der Glykogengehalt derselben Muskelgruppen bei verschiedenen Tieren

[1]) E. Külz, Zum Verhalten des Glykogens in der Leber und den Muskeln nach dem Tode. Pflügers Arch. 24 (1881).

derselben Spezies selbst bei möglichster Einhaltung gleicher physiologischer Bedingungen ist und wie sehr sich, selbst bei demselben Tiere, verschiedene Muskelgruppen hinsichtlich ihres Glykogengehaltes voneinander unterscheiden, wurden Parallelversuche stets an den symmetrischen Muskelpartien eines und desselben Tieres ausgeführt.

Meine Versuche bezogen sich, wie ich vorausschickend bemerken möchte, auf folgende physiologische Momente:

1. Sauerstoffzufuhr.
2. Zusatz arterialisierten und nicht arterialisierten Blutes.
3. Sauerstoffausschluß.
4. Ernährungszustand.
5. Herz- und Skelettmuskulatur.
6. Angestrengte Muskelarbeit und Ruhe; dauernde funktionelle Inanspruchnahme und dauernde Inaktivität der Muskulatur.
7. Rote und weiße Muskulatur.
8. Zeitdauer seit dem Tode des Tieres.
9. Alkaleszenz des Muskelgewebes.
10. Versuchstemperatur.

Die Glykogenbestimmungen wurden nach E. Pflügers[1]) vereinfachter Methode ausgeführt[2]).

---

[1]) E. Pflüger, Pflügers Arch. 103, 169.

[2]) Bei genauer Berücksichtigung aller Vorschriften Pflügers, die minutiös befolgt werden müssen, um jeden Zeitverlust zu vermeiden, bedarf es zu einer vollständigen Ausführung einer Bestimmung ungefähr 48 Stunden. Ich lasse die Vorschriften folgen: Die abpräparierte Muskulatur wird möglichst schnell fein zerhackt und gut gemischt. Eine Portion dieses Muskelbreies (100 g) wird in einen 500 ccm-Kolben gebracht, in welchem bereits 100 ccm einer 60proz Kalilauge (Kaliumhydrat Ia Merck) sieden. Dieser Kolben bleibt zwei Stunden lang im siedenden Wasserbade. Während dieser Zeit ist der Muskelbrei öfter mit einem Glasstabe vorsichtig umzurühren, damit die Verteilung der Muskelsubstanz in der Kalilauge besser vonstatten gehe. Dann läßt man abkühlen, gießt den Inhalt des Kolbens in ein Becherglas aus und gibt 200 ccm destilliertes Wasser hinzu, sodann fällt man mit 400 ccm 96proz. Alkohols. Das Ganze muß gut umgeschüttelt werden und wird bis zu vollständigem Absetzen des Niederschlages stehen gelassen. Hernach filtriert man durch ein schwedisches 15 cm-Filter (aus Munktells Fabrik) und wäscht zunächst mit einer Mischung von 1 Teil 15proz. Kalilauge und 2 Teilen 96proz. Alkohols, dann mit 60proz. Alkohol nach. Das Filtrat soll klar und goldgelb sein. Der Filterrückstand wird in siedendem Wasser gelöst (etwa 300 ccm), sodann das Filter in kochendem Wasser ausgiebig zerkleinert und die Flüssigkeit in ein Becherglas filtriert. Das Filtrat ist eine deutlich opalisierende, alkalisch reagierende Flüssigkeit. Man neutralisiert mit verdünnter Salzsäure. Nur bei starker Eiweißabscheidung filtriert man nochmals und kocht den Rückstand im Filter ein zweites Mal aus. Sodann setzt man konzentrierte Salzsäure von 1,19 spez. Gew. zu, bis der Gehalt der Flüssig-

3. Versuche.

Versuchsreihe I.

Sauerstoffzufuhr.

In diesen Versuchen wurde eine Portion Muskulatur in der Weise einem Sauerstoffstrome ausgesetzt, daß man sie mit physiologischer Kochsalzlösung in einen Kolben brachte, der mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen war. In den Löchern des Stopfens wurden Glasröhren angebracht, von denen eine fast bis zum Boden des Glaskolbens reichte, während die andere mit einer Saugpumpe in Verbindung stand; so konnte ein lebhafter Luftstrom durch den Muskelbrei geleitet werden; außerdem wurde der Kolben auch noch oft durchgeschüttelt.

Versuch 1. Kaninchen.

Das Abpräparieren der Muskulatur dauerte etwa 10 bis 15 Minuten.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten zerkleinert und gut gemischt.

I. 100 g Muskulatur + 0,5 g käufliches Glykogen[1]) sofort verarbeitet.

II. 100 g Muskulatur + 0,5 g käufliches Glykogen + 100 ccm physiologische NaCl-Lösung + 10 ccm Toluol wurde 4 Stunden lang bei 18° C stehen gelassen und dann verarbeitet.

III. sowie II., aber nach 4 Stunden währender Durchlüftung verarbeitet;

a) bedeutet in den Tabellen stets den Glykogenschwund in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens;

b) den absoluten Glykogenschwund in Gramm, auf 100 g Muskulatur umgerechnet.

Zeit vom Tode des Tieres an	Temperatur	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen		Glykogenschwund	
Stunden	°C		g		g	Proz.	a)	b)
—	18	0,5 g käufl. Glykogen	100		0,6023	0,60	—	—
4	18	0,5 g käufl. Glykogen, 100 ccm phys. NaCl-Lös., 10 ccm Toluol	100		0,4003	0,40	33,32	0,20
4	18	„	100	O-Durchlüft.	0,1141	0,12	80	0,48

keit an Salzsäure 2,2 Proz. beträgt. Hierauf erfolgt die Inversion durch dreistündiges Kochen der glykogenhaltigen Flüssigkeit im siedenden Wasserbade. Die Wägung des reduzierten Kupfers wurde nach F. Allihn (Journ. f. prakt. Chem. 30, 51, 1880) vorgenommen.

[1]) Die käuflichen Glykogenpräparate enthalten nach längerer Aufbewahrung vielfach mehr oder minder große Zuckermengen; die Angaben über den Glykogenzusatz beziehen sich auf die Mengen zugesetzten käuflichen Glykogenpräparates, nicht auf die wirklich in ihnen enthaltenen Glykogenmengen.

Versuch 2. Kaninchen.

Das Abpräparieren der Muskulatur nahm etwa 10 Minuten in Anspruch. Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	15	0,5 g käufl. Glykogen	50		0,5452	1,09	—	—
4	37	0,5 g käufl. Glykogen 50 ccm phys. NaCl-Lös. 10 ccm Toluol	50		0,0407	0,08	92,7	1,01
4	37	„	50	O-Durchlüft.	0,0244	0,05	95,4	1,04

Versuch 3. Kaninchen.

Das Abpräparieren dauerte etwa 20 Minuten. Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	15	0,5 g Glykog.	100		0,5394	0,54	—	—
4½	15	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. NaCl-Lös. 10 ccm Toluol	100		0,1346	0,14	74,0	0,40
4½	15	„	100	O-Durchlüft.	0,0953	0,10	81,4	0,44

Versuch 4. Kaninchen.

Das Abpräparieren der Muskulatur dauerte etwa 15 Minuten. Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	20	0,5 g Glykog.	100		0,5248	0,53	—	—
4	20	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. NaCl 10 ccm Toluol	100		0,1868	0,19	64,0	0,34
4	20	„	100	O-Durchlüft.	0,1492	0,15	71,5	0,38

Versuch 5. Kaninchen.

Das Abpräparieren dauerte etwa 20 Minuten.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	18	100 ccm phys. Na Cl 10 ccm Toluol	100		0,1598	0,16	—	—
1	18	„	100		0,0523	0,05	68,7	0,11
1	18	„	100	O-Durchlüft.	0,0368	0,04	75,0	0,12

In diesem Versuche wurde kein Glykogen zugesetzt, sondern nur das im Muskelgewebe selbst vorhandene Glykogen bestimmt.

Versuch 23a. Hund.

Das Abpräparieren der Muskulatur beanspruchte etwa 20 Minuten.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	18	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. Na Cl-Lös.	100		0,6430	0,64	—	—
2	18	„ plus 10 ccm Toluol	100		0,4381	0,44	31,2	0,20
2	18	„	100	O-Durchlüft.	0,2965	0,30	53,1	0,34

Der **Einfluß der Sauerstoffdurchlüftung** ergibt sich somit aus der folgenden Tabelle (I).

Tabelle I.

A bedeutet den Glykogenschwund in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens, auf 1 Stunde berechnet.

B bedeutet den absoluten Glykogenschwund in Gramm, auf 100 g Muskulatur und auf 1 Stunde berechnet.

Versuch	Tierart	Temperatur °C	Glykogenschwund ohne O-Durchlüftung *A*	Glykogenschwund ohne O-Durchlüftung *B*	Glykogenschwund mit O-Durchlüftung *A*	Glykogenschwund mit O-Durchlüftung *B*	Differenz *A*	Differenz *B*
Nr. 3	Kaninchen	15	16,44	0,09	18,10	0,10	1,66	0,01
„ 1	„	18	8,32	0,05	20,00	0,12	11,68	0,07
„ 4	„	18	16,00	0,08	17,87	0,09	1,87	0,01
„ 5	„	18	68,70	0,11	75,00	0,13	6,30	0,02
„ 23a	Hund	18	15,60	0,10	26,50	0,17	10,90	0,07
„ 2	Kaninchen	37	23,17	0,51	23,85	0,52	0,68	0,01

Sauerstoffzufuhr bedingt demnach eine immerhin merkliche und konstante Beschleunigung, bzw. eine Vergrößerung des postmortalen Glykogenschwundes.

Bei Durchsicht dieser Tabelle fällt in Versuch Nr. 5 Kolonne *A* durch die Größe der hier angegebenen Zahl auf. Während sich sonst die Zahlen in der Größenordnung zwischen 8 und 16 bewegen, ist hier der Glykogenschwund mit 68,7 Proz. verzeichnet, also ganz unverhältnismäßig hoch. Die Erklärung hierfür ist darin zu suchen, daß es sich um jenen Versuch handelt, in welchem ich der zu untersuchenden Muskulatur kein Glykogen zugesetzt hatte, sondern bloß den Eigengehalt des Muskels an Glykogen zur chemischen Bestimmung benutzte. Nach Verlauf einer Stunde war hier eben schon die geringe Menge des umzusetzenden Glykogens zum großen Teile verarbeitet worden, was in der Prozentzahl deutlicher zum Ausdruck kommt. In Versuch Nr. 2 springen die unter *B* aufgezeichneten Zahlen aus den sonstigen Zahlengrößen heraus, was mit der bei diesem Versuche in Anwendung gebrachten hohen Temperatur von 37° C (gegen 15 bis 18° C in den übrigen Versuchen) in Zusammenhang zu bringen ist.

Versuchsreihe II.

Zusatz arterialisierten und nicht arterialisierten Blutes.

Diese Versuchsreihe hatte den Zweck, den Einfluß des Blutzusatzes einerseits, den des Blutzusatzes in Kombination mit O-Durchlüftung andererseits auf den postmortalen Muskelglykogenschwund festzustellen. Ich benutzte nur Blut desselben Tieres als Zusatzflüssigkeit.

Versuch 6. Kaninchen.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Das Tier wurde durch Entbluten aus der Carotis getötet. Die Menge des erhaltenen Blutes betrug 60 ccm; diese wurden mit 10 ccm einer 1proz. Kaliumoxalatlösung versetzt, um die Gerinnung zu verhindern.

Das Abpräparieren der Muskulatur beanspruchte etwa 25 Minuten.

Zeit vom Tode des Tieres an	Temperatur	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen		Glykogenschwund	
Stunden	° C		g		g	Proz.	a)	b)
—	22	70 ccm phys. NaCl-Lös. 5 ccm 1 proz. K-Oxalat-Lösung	70		0,1102	0,16	—	—
1	22	70 ccm phys. NaCl-Lös. 5 ccm 1 proz. K-Oxalat-Lösung 5 ccm Toluol	50		0,0184	0,04	75,00	0,12

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
1	22	40 ccm phys. NaCl-Lös. 30 ccm Blut + 5 ccm 1 proz. K-Oxalat 5 ccm Toluol	50	Blutzusatz	0,0157	0,03	81,20	0,13
1	22	„	50	Blutzusatz u. O-Durchlüft.	0,0096	0,02	87,50	0,14

Versuch 7. Hund.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Tötung des Tieres durch Entbluten aus der Carotis. Die Menge des erhaltenen Blutes betrug 80 ccm; diese wurden zur Hintanhaltung der Gerinnung mit 20 ccm einer 1 proz. Kaliumoxalatlösung versetzt.

Das Abpräparieren der Muskulatur dauerte etwa 20 Minuten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	20	100 ccm phys. NaCl-Lös. 10 ccm 1 proz. K-Oxalatlös. 0,5 g Glykog.	50		0,5295	1,06	—	—
1	20	„ dazu noch 5 ccm Toluol	50		0,4818	0,96	9,40	0,10
1	20	50 ccm phys. NaCl-Lös. 40 ccm Blut + 10 ccm 1 proz. K-Oxalatlös. 0,5 g Glykog. 5 ccm Toluol	50	Blutzusatz	0,3896	0,78	26,40	0,28
—	20	„	—	Blutzusatz u. O-Durchlüft.	0,2461	0,49	53,80	0,57

Versuch 8. Kaninchen.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten.

Das Abpräparieren der Muskulatur beanspruchte etwa 20 Minuten.

Tötung des Tieres durch Entbluten aus der Carotis; 60 ccm Blut wurden erhalten und mit 20 ccm 1 proz. K-Oxalat versetzt.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	20	90 ccm phys. NaCl-Lös. 10 ccm 1proz. K-Oxalatlös. 0,5 g Glykog.	100		0,428	0,43	—	—
1	20	" u.5ccmToluol	100		0,2562	0,26	39,5	0,17
1	20	50 ccm phys. NaCl-Lös. 30 ccm Blut + 10 ccm 1 proz. K-Oxalat 0,5 g Glykog., 5 ccm Toluol	100	Blutzusatz	0,2527	0,25	41,9	0,18
1	20	"	100	Blutzusatz u. O-Durchlüft.	0,1936	0,19	55,8	0,24

Versuch 17. Hund.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten. Das Abpräparieren dauerte etwa 25 Minuten.

Tötung des Tieres durch Entbluten aus der Carotis. Die Ausbeute an Blut betrug 80 ccm. Dieses wurde mit 20 ccm einer 1 proz. K-Oxalatlösung versetzt.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	15	100 ccm phys. NaCl-Lös. 10 ccm 1 proz. K-Oxalatlös. 0,5 g Glykog.	100		0,4382	0,44	—	—
1	15	" u.5ccmToluol	100		0,3425	0,34	22,7	0,10
1	15	50 ccm phys. NaCl-Lös. 40 ccm Blut + 10 ccm K-Oxalat 0,5 g Glykog. 5 ccm Toluol	100	Blutzusatz	0,3164	0,32	27,2	0,12
1	15	"	100	Blutzusatz u. O-Durchlüft.	0,2126	0,21	52,3	0,23

Versuch 24. Hund.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten. Das Abpräparieren der Muskulatur beanspruchte ungefähr 20 Minuten.

Tötung des Tieres durch Entbluten aus der Carotis. 100 ccm Blut wurden aufgefangen und mit 20 ccm einer 1 proz. K-Oxalatlösung versetzt.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	20	100 ccm phys. NaCl, 10 ccm 1 proz. K-Oxalatlös. 0,5 g Glykog.	100		0,5274	0,53	—	—
4	20	" u. 5 ccm Toluol	100		0,400	0,40	24,5	0,13
4	20	50 ccm phys. NaCl-Lös. 50 ccm Blut + 10 ccm 1 proz. K-Oxalat 0,5 g Glykog., 5 ccm Toluol	100	Blutzusatz	0,2952	0,30	43,4	0,23
4	20	"	100	Blutzusatz u. O-Durchlüft.	0,2104	0,21	60,4	0,32

Tabelle II und III veranschaulichen übersichtlich die Wirkung, welche Blutzusatz bzw. Blutzusatz in Kombination mit Sauerstoffdurchlüftung auf den postmortalen Muskelglykogenschwund ausübt.

Tabelle II.

A bezeichnet den Glykogenschwund in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens, auf eine Stunde berechnet.

B bezeichnet den absoluten Glykogenschwund in Gramm, auf 100 g Muskulatur und auf 1 Stunde berechnet.

Versuch	Tierart	Temperatur °C	Glykogenschwund ohne Blutzusatz *A*	Glykogenschwund ohne Blutzusatz *B*	Glykogenschwund mit Blutzusatz *A*	Glykogenschwund mit Blutzusatz *B*	Differenz *A*	Differenz *B*
Nr. 17	Hund	15	22,7	0,10	27,2	0,12	4,5	0,02
" 7	"	20	9,4	0,09	26,4	0,28	17,0	0,19
" 8	Kaninchen	20	39,5	0,17	41,9	0,18	2,4	0,01
" 24	Hund	20	6,1	0,03	10,8	0,06	4,7	0,03
" 6	Kaninchen	22	75,0	0,12	81,2	0,13	6,2	0,01

Blutzusatz, und zwar Blut von demselben Tiere, von dem auch die Muskulatur entnommen wurde, steigert unzweifelhaft den Glykogenabbau im Muskel.

Tabelle IIa.

Versuch	Tierart	Temperatur °C	Glykogenschwund ohne Blutzusatz und ohne O-Durchl. A	B	Glykogenschwund mit Blutzusatz und O-Durchlüft. A	B	Differenz A	B
Nr. 17	Hund	15	22,7	0,10	52,3	0,23	29,6	0,13
„ 7	„	20	9,4	0,09	53,8	0,56	44,4	0,47
„ 8	Kaninchen	20	39,5	0,17	55,8	0,24	16,3	0,07
„ 24	Hund	20	6,1	0,03	15,1	0,08	9,0	0,05
„ 6	Kaninchen	22	75,0	0,12	87,5	0,14	12,5	0,02

Die Kombination von Blutzusatz zur Muskulatur mit energischer Sauerstoffdurchlüftung kann demnach eine erhebliche Steigerung der Glykogenzersetzung hervorrufen (in einem Falle betrug das Plus pro Stunde 0,47 g pro 100 g Muskulatur).

Versuchsreihe III.

Sauerstoffausschluß.

Versuch 16. Kaninchen.

Eine Portion der Muskulatur wurde mit physiologischer Kochsalzlösung in einen Glaskolben gebracht und mehrere Stunden lang einem lebhaften Wasserstoffstrome ausgesetzt. Der Kolben stand einerseits mit dem Kippschen Apparat, in welchem das Wasserstoffgas erzeugt wurde, andererseits mit einer Saugpumpe in Verbindung, so daß das Wasserstoffgas in starkem Strome den Muskelbrei durchsetzte. Um möglichst alle Teile des Muskelbreies dem Wasserstoff auszusetzen, wurde noch häufig geschüttelt[1]).

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Proz.	Glykogenschwund a)	b)
—	15	50 ccm phys. NaCl-Lös.	50		0,1426	0,28	—	—
4	15	„ u. 5 ccm Toluol	50		0,0983	0,19	32,1	0,09
4	15	„	50	Wasserstoffgas-Durchl.	0,0765	0,15	46,4	0,13

[1]) Dasselbe gilt auch für die folgenden Versuche.

Versuch 18. Kaninchen.

Muskulatur von Rumpf und Extremitäten.

Das Abpräparieren der Muskulatur dauerte etwa 20 Minuten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	17	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. NaCl-Lös.	100		0,4238	0,42	—	—
4	17	" u. 5 ccm Toluol	100		0,3620	0,36	14,3	0,06
4	17	"	100	Wasserstoffgasdurchlüft.	0,3157	0,31	26,1	0,11

Versuch 18a. Kaninchen.

Muskulatur von Rücken und Extremitäten. Das Abpräparieren derselben dauerte 25 Minuten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	18	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	50		0,4735	0,95	—	—
4	18	" u. 5 ccm Toluol	50		0,2814	0,56	41,0	0,39
4	18	"	50	Wasserstoffgasdurchlüft.	0,2946	0,59	36,0	0,36

Die folgende Tabelle (III) faßt die Resultate bei Wasserstoffgasdurchlüftung übersichtlich zusammen.

Tabelle III.

A bedeutet den Glykogenschwund in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens.

B bedeutet den absoluten Glykogenschwund in Gramm, auf 100 g Muskulatur, beide auf 1 Stunde berechnet.

Versuch	Tierart	Temperatur °C	Glykogenschwund ohne H-Durchlüftung *A*	Glykogenschwund ohne H-Durchlüftung *B*	Glykogenschwund mit H-Durchlüftung *A*	Glykogenschwund mit H-Durchlüftung *B*	Differenz *A*	Differenz *B*
Nr. 16	Kaninchen	15	8,0	0,02	11,6	0,03	3,6	0,01
" 18	"	17	3,5	0,02	6,5	0,03	3,0	0,01
" 18a	"	18	10,2	0,09	9,0	0,09	— 1,2	—

In zwei Versuchen rief die Wasserstoffgasdurchlüftung eine geringe Beschleunigung der Glykogenzersetzung hervor, was wohl

auf die mechanische Wirkung des Schüttelns und des Gasstromes zurückzuführen ist. Der dritte Versuch fiel vollkommen negativ aus. Wasserstoffdurchlüftung beeinflußt demnach den Muskelglykogenschwund nicht in charakteristischer Weise.

Im Anschluß an diese Beobachtungen füge ich einen Versuch an, in welchem der Einfluß, welchen Stickstoffdurchlüftung auf den postmortalen Glykogenschwund ausübt, einer Prüfung unterzogen wurde.

Versuch 23. Hund.

Das Abpräparieren der Muskulatur erforderte 20 Minuten.

Eine Portion des von Rücken und Extremitäten stammenden Muskelbreies wurde in einem Glaskolben, der einerseits mit einem mit Stickstoffgas gefüllten Gasometer, andererseits mit einer Saugpumpe in Verbindung stand, durch 2 Stunden einem starken Stickstoffgasstrom ausgesetzt.

Zeit vom Tode des Tieres an	Temperatur	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen		Glykogenschwund	
Stunden	°C		g		g	Proz.	a)	b)
—	18	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	100		0,6430	0,64	—	—
2	18	" u. 5 ccm Toluol	100		0,4381	0,44	31,2	0,20
2	18	"	100	Stickstoffgasdurchlüft.	0,4215	0,42	33,0	0,22

Die Differenz zwischen dem Glykogenschwund ohne und mit N-Durchlüftung ist sonach nur eine geringe und ist wohl auch nur auf den mechanischen Einfluß der Durchströmung und des Schüttelns zurückzuführen.

Versuchsreihe IV.

Ernährungszustand.

Die folgende Versuchsreihe hatte den Zweck, die Größe des postmortalen Glykogenschwundes der Muskulatur bei gutem Ernährungszustande und im Hunger zu vergleichen. Zu einem Versuche wurde stets Muskulatur ein und desselben Tieres verwendet.

Versuch 12. Hund.

Einem $10\frac{3}{4}$ kg schweren Hunde, der durch 4 Tage reichlich mit Fleisch, Zucker usw. genährt worden war, amputierte ich die linke hintere Extremiät unter Beobachtung aseptischer Kautelen etwa 2 cm unterhalb des Femurkopfes; die Gefäße wurden unterbunden, die Wunde gesäubert und vernäht. Der Hund erhielt fortan keine Nahrung mehr und ging nach 2 Tagen zugrunde. Die Muskulatur der linken Extremität

gehörte also einem gut genährten, kräftigen Tiere an, die post mortem von der rechten Hinterextremität abpräparierte Muskulatur entstammte demselben Tiere, das aber stark heruntergekommen war.

Zeit von der Abtrennung er Muskulatur an	Temperatur	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen		Glykogenschwund	
Stunden	°C.			g		g	Proz.	a)	b)
—	18	vom amputierten linken Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. Na-Cl-Lös.	100	Muskulatur von dem gut genährten Tiere stammend	0,6283	0,63	—	—
1	18		" u. 15 ccm Tol.	100		0,4543	0,45	28,6	0,18
—	18	vom rechten Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. Na-Cl-Lös.	100	Muskulatur, von dem hungernden Tiere stammend	0,6855	0,69	—	—
1	18		" u. 15 ccm Tol.	100		0,4987	0,50	27,5	0,19

Versuch 13. Hund.

Amputation der linken Hinterextremität eines gut genährten Hundes, Vernähung der Wunde; das Tier erhielt sodann keine Nahrung mehr, nach 36 Stunden trat der Tod ein. Die Vergleichsprüfung erfolgte an der Muskulatur der rechten Hinterextremität.

Zeit von der Abtrennung er Muskulatur an	Temperatur	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen		Glykogenschwund	
Stunden	°C			g		g	Proz.	a)	b)
—	18	vom amputierten linken Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. Na Cl-Lös.	100	Muskulatur von dem gut genährten Tiere stammend	0,6256	0,63	—	—
4	18		" u. 10 ccm Tol.	100		0,3846	0,39	38,1	0,24
—	18	vom rechten Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. Na Cl-Lös.	100	Muskulatur von dem hungernden Tiere stammend	0,5874	0,59	—	—
4	18		" u. 10 ccm Tol.	100		0,3995	0,40	32,2	0,19

Versuch 14. Hund.

Amputation der linken Hinterextremität, Vernähung der Wunde. Nach der Operation wurde das Tier hungern gelassen und ging nach 60 Stunden zugrunde. Zum Vergleiche wurde post mortem die Muskulatur der rechten Hinterextremität herangezogen.

Zeit von der Abtrennung der Muskulatur an	Temperatur	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen		Glykogenschwund	
Stunden	°C			g		g	Proz.	a)	b)
—	18	Linker Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. NaCl	100	Muskulatur von dem gut genährten Tiere stammend	0,6844	0,69	—	—
4	18		" u. 10 ccm Tol.	100		0,3672	0,37	46,4	0,32
—	18	Rechter Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 100 ccm phys. NaCl	100	Muskulatur von dem hungernden Tiere stammend	0,4764	0,48	—	—
4	18		" u. 10 ccm Tol.	100		0,2053	0,21	56,3	0,27

Tabelle IV.

Zur Übersicht über die Ergebnisse der postmortalen Glykogenzersetzung in den Muskeln hungernder und gut genährter Tiere.

A bedeutet den Glykogenschwund in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens.

B bedeutet den absoluten Glykogenschwund in Gramm, berechnet auf 100 g Muskulatur, beide auf 1 Stunde berechnet.

Versuch	Tierart	Temperatur	Glykogenschwund der gut genährten Muskulatur		Glykogenschwund der Muskulatur eines hungernden Tieres		Differenz	
		°C	*A*	*B*	*A*	*B*	*A*	*B*
Nr. 12	Hund	18	28,6	0,18	27,5	0,19	— 1,1	+ 0,01
„ 13	"	18	9,5	0,06	8,05	0,05	— 1,0	— 0,01
„ 14	"	18	11,6	0,08	14,0	0,07	+ 2,4	+ 0,01

Der postmortale Muskelglykogenschwund wird also von dem Umstande, ob das Tier sich vor der Muskelentnahme in gutem oder schlechtem Ernährungszustande befunden hat, nicht wesentlich beeinflußt.

Versuchsreihe V.

Herz- und Skelettmuskulatur.

In den hier verzeichneten Versuchen wurde der Unterschied bezüglich der postmortalen Glykogenzersetzung zwischen Herz- und Extremitätenmuskulatur einer Prüfung unterzogen.

Versuch 20. Kaninchen.

Das Tier wurde durch Nackenhieb getötet. Das Abpräparieren der Muskulatur erforderte etwa 10 Minuten.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	18	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	50	Schenkelmuskulatur	0,4735	0,95	—	—
4	18	" u. 5 ccm Toluol	50	"	0,2946	0,59	36,0	0,56
—	18	0,5 g Glykog. 20 ccm phys. NaCl-Lös.	20	Herzmuskulatur	0,3867	1,93	—	—
4	18	" u. 5 ccm Toluol	20	"	0,1105	0,55	70,9	1,38

Versuch 21. Kaninchen.

Tötung des Tieres durch Nackenhieb. Die Muskulatur wurde in etwa 10 Minuten abpräpariert.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	15	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	50	Schenkelmuskulatur	0,5234	1,05	—	—
4	15	" u. 5 ccm Toluol	50	"	0,3840	0,77	26,7	0,28
—	15	0,5 g Glykog. 20 ccm phys. NaCl-Lös.	20	Herzmuskulatur	0,3722	1,86	—	—
4	15	" u. 5 ccm Toluol	20	"	0,1034	0,52	72,0	1,34

Tabelle V.

A bedeutet den Glykogenschwund in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens.

B bedeutet den absoluten Glykogenschwund in Gramm, auf 100 g Muskulatur, beide auf 1 Stunde berechnet.

Versuch	Tierart	Temperatur °C	Glykogenschwund der Schenkelmuskulatur A	Glykogenschwund der Schenkelmuskulatur B	Glykogenschwund der Herzmuskulatur A	Glykogenschwund der Herzmuskulatur B	Differenz A	Differenz B
Nr. 21	Kaninchen	15	6,60	0,07	18,0	0,36	11,4	0,29
" 20	"	15	9,00	0,08	17,7	0,34	8,7	0,26

Es ist also zweifellos, daß die Herzmuskulatur eine viel größere Leistung bezüglich der postmortalen Glykogenzersetzungsarbeit vollbringt, als die Extremitätenmuskulatur.

Versuchsreihe VI.

Arbeitende — ruhende Muskulatur.

Versuch 9.

Einer $17^1/_2$ kg schweren 4jährigen Hündin wurde in Äthernarkose der linke Nervus ischiadicus und der linke N. sartorius durchschnitten; hierauf wurden dem Tiere 5 mg Strychninum nitricum subcutan injiziert. Nach etwa 8 Minuten stellten sich tonisch-klonische Muskelkrämpfe geringen Grades ein, von denen nur die Muskulatur des linken Hinterschenkels verschont blieb. $1^1/_2$ Stunden später wurden neuerdings 5 mg Strychnin. nitric., und zwar diesmal in die Bauchhöhle injiziert, worauf sich kurzdauernde Krämpfe einstellten; $1^1/_2$ Stunden darauf injizierte ich nochmals 5 mg Strychn. intraperitoneal, als deren Wirkung heftigste klonische Muskelkrämpfe auftraten, an denen das Tier nach etwa 45 Minuten zugrunde ging. Die linke Hinterextremität war von den Strychninkrämpfen vollkommen verschont geblieben.

Die Muskulatur der rechten Hinterextremität befand sich also vor dem Tode in angestrengtester Tätigkeit, die der linken in vollkommener Ruhe.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	20	Linker Hinterschenkel	0,5 g Glyk.[1] 50 ccm phys. NaCl-Lös.	35	Vor dem Tode in vollkommener Ruhe befindliche Muskulatur	0,322	0,93	—	—
1	20		" u. 5 ccm Toluol	35		0,306	0,90	7,9	0,03
—	20	Rechter Hinterschenkel	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	35	Vor dem Tode in heftigster Arbeit befindliche Muskulatur	0,308	0,90	—	—
1	20		" u. 5 ccm Toluol	35		0,292	0,87	6,8	0,03

[1]) Das Glykog. purissimum (Merck) enthielt zur Zeit, als ich diesen Versuch anstellte, nachdem die Flasche, in welcher es aufbewahrt wurde, bereits 5 Wochen geöffnet gestanden hatte, bei quantitativer Nachprüfung nur noch 0,2582 g reines Glykogen auf 0,500 g des Pulvers; der Rest war bereits verzuckert.

Versuch 10. Hund.

Einem $8^1/_2$ kg schweren Hunde wurde der linke N. ischiadicus und der linke N. sartorius in Äthernarkose durchtrennt und die Wunde vernäht. Die linke Hinterextremität wurde stark nachgeschleppt. Nach 24 Stunden wurden 10 mg Strychnin. nitric. intraperitoneal injiziert, worauf nach etwa 10 Minuten tonisch-klonische Krämpfe der Muskulatur — jene der linken Hinterextremität ausgenommen — einsetzten. Diese Muskelkrämpfe hielten ungefähr 50 Minuten an; kurz danach starb das Tier.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	18	Linker Hinterschenkel	50 ccm phys. NaCl-Lös.	50	Vor dem Tode in vollkommener Ruhe befindliche Muskulatur	0,2514	0,50	—	—
4	18		" u. 5 ccm Toluol	50		0,1442	0,28	56,0	0,22
—	18	Rechter Hinterschenkel	50 ccm phys. NaCl-Lös.	50	Vor dem Tode in heftigster Arbeit befindliche Muskulatur	0,1622	0,32	—	—
4	18		" u. 5 ccm Toluol	50		0,0641	0,13	58,0	0,19

Tabelle VI.

A und *B* haben dieselbe Bedeutung wie in Tabelle V.

Versuch	Tierart	Temperatur °C	Glykogenschwund der vor dem Tode in vollkommener Ruhe befindlichen Muskulatur		Glykogenschwund der vor dem Tode in heftigster Arbeit befindlichen Muskulatur		Differenz	
			A	*B*	*A*	*B*	*A*	*B*
Nr. 9	Hund	20	7,9	0,03	6,8	0,03	1,1	—
" 10	"	18	14,0	0,05	14,5	0,05	—	—

In dieser Übersicht kommt deutlich zum Ausdruck, daß es für das Vermögen der Muskulatur, post mortem Glykogen abzubauen, ganz gleichgültig ist, ob sie vorher in heftigster Anstrengung oder in vollkommener Ruhe sich befunden hat.

Zweck des folgenden Versuches war es, darzutun, ob ein dauernd in Ruhe befindlicher, also inaktiver Muskel bezüglich der postmortalen Glykogenzersetzung sich anders verhalte als ein aktiver. Als Versuchstier wurde das Huhn gewählt, dessen Brustmuskulatur zwar kräftig entwickelt ist, aber doch nur minimal in Anspruch genommen wird.

Versuch 22. Huhn.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat.	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	15	Brustmuskulatur	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	50	Inaktive Brustmuskulatur	0,4771	0,95	—	—
3	15		" u.5ccmToluol	50		0,1622	0,32	66,32	0,63
—	15	Schenkelmuskulatur	0,5 g Glykog. 50 ccm phys. NaCl-Lös.	50	Aktive Schenkelmuskulatur	0,4234	0,85	—	—
3	15		" u.5ccmToluol	50		0,1120	0,22	71,80	0,63

Aktive und inaktive Muskulatur weisen hinsichtlich der postmortalen Glykogenzersetzung keinerlei Unterschied auf.

Versuchsreihe VII.

Rote und weiße Muskulatur.

Der nachstehend angeführte Versuch erbringt den Beweis, daß der roten wie der weißen Muskulatur die quantitativ gleiche Fähigkeit der postmortalen Glykogenumwandlung zugesprochen werden muß.

Versuch 19. Kaninchen.

Es wurde die Muskulatur vom Rücken (weiße M.) und die der Extremitäten (rote Muskulatur) gesondert untersucht.

Zeit vom Tode des Tieres Stunden	Temperatur °C	Art der Muskulat.	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	15	rote Schenkelmuskulat.	0,5 g Glykogen 50 ccm phys. NaCl-Lösung	50	Rote Musk.	0,5234	1,05	—	—
4	15	"	" und 5 ccm Toluol	50		0,3840	0,77	26,7	0,28
—	15	Weiße Rückenmuskulat.	0,5 g Glykogen 50 ccm phys. NaCl-Lösung	50	Weiße Musk.	0,5382	1,06	—	—
4	15	"	" und 5 ccm Toluol	50		0,3975	0,80	24,6	0,26

Pro Stunde ergibt sich ein Glykogenschwund von 6,7 Proz. bzw. 0,07 g für die rote, ein solcher von 6,1 Proz. bzw. 0,07 g für die weiße Muskulatur, die Differenz ist demnach = 0.

Versuchsreihe VIII.

Zeitdauer seit dem Tode des Tieres.

Um zu prüfen, inwiefern die seit dem Tode des Tieres verstrichene Zeit Einfluß auf die Fähigkeit des Muskels, im Überschusse zugesetztes Glykogen abzubauen, ausübt, wurde der nachfolgende Versuch angestellt:

Versuch 11. Kaninchen.

Einem $1\frac{1}{2}$ kg schweren Tiere wurde 1 mg Strychnin. nitric. subcutan injiziert; etwa zehn Minuten darauf traten fünf Minuten lang anhaltende Muskelzuckungen auf; am nächsten Tage tracheotomierte ich das Tier und hielt es unter künstlicher Respiration; nach Injektion von 2 mg Strychnin in die Bauchhöhle traten sehr heftige, die ganze Körpermuskulatur betreffende klonisch-tonische Krämpfe auf, unter denen das Tier auch im Verlauf von ungefähr einer Stunde zugrunde ging.

Nun präparierte ich die Muskulatur von Rücken und Extremitäten ab und teilte sie in fünf Portionen zu je 50 g, nachdem ich sie fein zerhackt und gut gemischt hatte.

1. Eine Portion wurde **sofort** verarbeitet.

2. Eine Portion wurde nach Zusatz von 0,5 g Glykogen und 50 ccm physiol. NaCl-Lösung ebenfalls **sofort** verarbeitet.

3. Eine Portion wurde nach Zusatz von 0,5 g Glykogen, 50 ccm physiol. NaCl-Lösung und 5 ccm Toluol **eine Stunde** lang bei 18° C stehen gelassen und dann verarbeitet.

4. Eine Portion wurde nach Zusatz von 50 ccm physiol. NaCl-Lösung und 5 ccm Toluol **zwei Stunden** lang bei 18° C stehen gelassen, dann wurden 0,5 g Glykogen zugesetzt und nach **einer Stunde** verarbeitet.

5. Eine Portion wurde nach Zusatz von 50 ccm physiol. NaCl-Lösung und 5 ccm Toluol **fünf Stunden** lang bei 18° C stehen gelassen, dann wurden 0,5 g Glykogen zugesetzt und nach **einer Stunde** verarbeitet.

Aus der umstehenden Tabelle ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß der Muskel die Fähigkeit besitzt, ihm zugesetztes Glykogen, unabhängig davon, wie lange Zeit seit dem Tode verstrichen ist, und zwar in quantitativ fast vollkommen gleichem Ausmaße abzubauen. Die Fähigkeit des Muskels, Glykogen zu zersetzen, ist somit eine auch nach dem Tode konstante und erleidet innerhalb einer gewissen Zeit keine merkliche Einbuße; der vom Körper losgetrennten Muskulatur wohnt die andauernde Kraft inne, über ihren eigenen

Glykogenvorrat hinaus eine das Glykogen umwandelnde Arbeit zu leisten.

	Temperatur °C	Zeit des Glykogenzusatzes	Zeit der Verarbeitung	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
I	18	—	sofort post mortem	50		Spuren	—	—	—
II	18	sofort post mortem	sofort post mortem	50		0,3607	0,72	—	—
III	18	sofort post mortem	1 Stunde post mortem	50	1 Stunde nach dem Glykogenzusatz und 1 Stunde nach dem Tode	0,1967	0,40	44,4	0,32
IV	18	2 Stunden post mortem	3 Stunden post mortem	50	1 Stunde nach dem Glykogenzusatz und 3 Stunden nach dem Tode	0,2040	0,41	43,1	0,31
V	18	5 Stunden post mortem	6 Stunden post mortem	50	1 Stunde nach dem Glykogenzusatz und 6 Stunden nach dem Tode	0,2201	0,44	37,5	0,28

Versuchsreihe IX.

Alkali- und Säurezusatz.

Um festzustellen, ob ein Zusatz von Alkali oder Säure eine erhebliche Vermehrung der Glykogenzersetzung hervorzurufen imstande sei, wurde der untenstehend angeführte Versuch angestellt:

Versuch 15.

Einem $2^1/_2$ kg schweren Kaninchen wurde Muskulatur von Rücken und Extremitäten entnommen; das Abpräparieren derselben beanspruchte etwa 20 Minuten. Der gut verteilte und fein zerhackte Muskelbrei wurde in vier Portionen zu je 50 g geteilt.

Zeit vom Tode des Tieres an Stunden	Temperatur °C	Zusatz	Gewicht der Muskulat. g	Bemerkungen	Glykogen g	Glykogen Proz.	Glykogenschwund a)	Glykogenschwund b)
—	35	0,5 g Glykogen 10 ccm physiol. Na Cl-Lösung 5 ccm Toluol	50		0,6025	1,20	—	—
3	35	" und 10 ccm $^1/_{10}$-Normal-H_2SO_4	50	Zusatz von 10 ccm $^1/_{10}$-Normal-Schwefelsäure	0,1663	0,34	71,8	0,86
3	35	0,5 g Glykogen und 10 ccm phys. Na Cl-Lösung 5 ccm Tolul	50		0,1620	0,32	73,3	0,88
3	35	" und 10 ccm $^1/_{10}$-Normal-Na OH	50	Zusatz von 10 ccm $^1/_{10}$-Normal-Natronlauge	0,1575	0,32	73,3	0,88

Aus dem Ergebnis dieses Versuches darf wohl der Schluß gezogen werden, daß Übersäuerung sowohl wie Neutralisation der im Muskel postmortal auftretenden Säure keinen Einfluß auf die Glykogenumwandlung übt[1]).

Versuchsreihe X.

Temperatur.

Umstehende Tabelle soll darüber Aufschluß geben, welche Rolle die Höhe der Temperatur, bei welcher die Muskulatur gehalten wird, bezüglich der Größe des Glykogenabbaues im Muskel spielt.

Bei Kaninchen beträgt der Glykogenschwund pro Stunde und 100 g Muskulatur:

bei 15° C durchschnittlich . . . . 0,07 g
„ 18° C „ . . . . 0,08 „
„ 20 bis 22° C durchschnittlich . . . . . 0,15 „
„ 35 bis 37° C „ . . . . . 0,40 „

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß die Geschwindigkeit der postmortalen Umwandlung des Glykogens mit der Temperatur wächst und bei Brutofentemperatur ein

[1]) Die postmortale Säurebildung im Muskel beträgt nach O. v. Fürths Angaben (diese Beitr. 3, 558) 6,7 bis 12,8 ccm $^1/_{10}$ Normal-Säure pro 100 g Muskel.

Vielfaches des bei Zimmertemperatur gefundenen Wertes beträgt.

Versuchs-nummer	Tierart	Tempe-ratur °C	Glykogenschwund pro Stunde in Prozenten des ursprünglich vorhandenen Glykogens	Absoluter Glykogenschwund pro Stunde und auf 100 g Muskulatur berechnet
3	Kaninchen	15	16,44	0,09
17	Hund	15	22,70	0.10
21	Kaninchen	15	6,60	0,07
16	„	15	8,00	0,02
22	Huhn	15	22,10	0,21
22	„	15	23,90	0,21
19	Kaninchen	15	6,67	0,07
19	„	15	6,15	0,07
18	„	17	3,50	0,02
18a	„	18	10.20	0,09
1	„	18	8,32	0,05
4	„	18	16.00	0,08
5	„	18	68,70	0,11
23a	Hund	18	15,60	0,10
20	Kaninchen	18	9,00	0,08
12	Hund	18	28,60	0,18
13	„	18	9,50	0,06
14	„	18	11,60	0,08
10	„	18	14,00	0,05
7	„	20	9,40	0,09
8	Kaninchen	20	39,50	0.17
24	Hund	20	6,10	0,03
9	„	20	7,90	0,03
6	Kaninchen	22	75,00	0,12
15	„	35	24,40	0,29
2	„	37	23,17	0,51

4. Schlußfolgerungen.

Fragen wir uns nunmehr, welche Schlüsse aus den vorliegenden Versuchsreihen gezogen werden können, so ergibt sich folgendes:

Was zunächst die Natur des Vorganges, welcher dem postmortalen Glykogenschwunde zugrunde liegt, betrifft, so sind bekanntlich, seitdem Nasse ein amylolytisches Ferment in den Muskeln beschrieben und mit der Umwandlung von Glykogen in Zucker in Zusammenhang gebracht hat, die Mehrzahl der Autoren der Ansicht, daß es sich hierbei um einen fermentativen Prozeß handle. Doch fehlt es auch noch in neuester Zeit nicht an Meinungen, denen zufolge der postmortale Glykogenschwund in den Organen

als Äußerung der vitalen Tätigkeit überlebender Organzellen aufzufassen wäre (Noël-Paton, Cavazzani, Dastre, Monier u. a.). Aus meinen Beobachtungen (Versuchsreihe VIII), denen zufolge der Glykogenschwund viele Stunden lang nach dem Tode dieselbe Größe behält, geht unzweifelhaft hervor, daß es sich unmöglich um eine Wirkung überlebender Zellen handeln könne. Man ist vielmehr in Übereinstimmung mit dem kürzlich wiederum von Fr. Pick[1]), sowie auch von Borchard[2]) unter Röhmanns Leitung erbrachten Beweise der Existenz eines glykogenspaltenden Fermentes berechtigt, auch den postmortalen Glykogenschwund in den Muskeln auf die Tätigkeit eines diastatischen Fermentes zu beziehen. Im Einklang mit der Fermentnatur des Vorganges steht die charakteristische Art, in welcher er durch die Temperatur beeinflußt wird (Versuchsreihe X).

Bezüglich der absoluten Größe des postmortalen Glykogenschwundes zeigte es sich, daß sie bei den verschiedenen Individuen derselben Art weitgehenden Schwankungen unterworfen ist. Bei Gegenwart eines Überschusses an Glykogen und bei 15 bis 18° C betrug die von 100 g Skelettmuskeln pro Stunde verzuckerte Glykogenmenge in meinen Versuchen bei Hunden 0,03 bis 0,18 g, bei Kaninchen 0,02 bis 0,17 g, bei Hühnern 0,21 g.

Zwischen verschiedenen Skelettmuskelpartien desselben Individuums ergaben sich keine erheblichen Unterschiede, auch wenn einerseits weiße, andererseits rote Muskeln miteinander verglichen wurden (Versuchsreihe VII).

Eine Ausnahmsstellung kommt dagegen dem Herzen zu, dessen diastatisches Vermögen sich vier bis fünfmal größer erwies als dasjenige der Skelettmuskulatur derselben Tiere (Versuchsreihe V; vergleiche auch die einschlägigen Versuche Boruttaus).

Es fragt sich nun weiter, welche Faktoren für die Schwankungen des diastatischen Vermögens der Muskeln verantwortlich gemacht werden könnten.

Die hinsichtlich anderer fermentativer Vorgänge vorliegenden Erfahrungen legen den Gedanken nahe, daß etwa Alkaleszenzänderungen von ausschlaggebender Bedeutung sein könnten. Es ergab sich jedoch, daß dieselben (zumindest in jenen Breiten, welche physiologisch bei der postmortalen Säuerung des Muskels

[1]) Friedel Pick: „Über das glykogenspaltende Ferment der Leber“, diese Zeitschr. 3, 163 bis 183.

[2]) Borchard: „Über das zuckerbildende Ferment der Leber“, Pflügers Arch. 100, 289.

in Betracht kommen) den Schwund des Muskelglykogens nicht merklich beeinflussen (Versuchsreihe IX).

Es wurde ferner untersucht, ob der Ernährungszustand oder aber die Tätigkeit für das diastatische Vermögen der Muskeln wesentlich sei. Während sich bei gut genährten Tieren die Glykogendepots der Muskeln ebenso wie der Leber mit diesem Reservestoffe füllen, sehen wir im Hunger die Glykogenvorräte schnell schwinden; ähnliche Verhältnisse gelten bekanntlich auch für die Muskelarbeit. Der Muskel verfügt zweifellos über Einrichtungen, welche ihm gestatten, die Glykogenreserven schnell zu mobilisieren, sobald ein Bedarf an Zucker eintritt, d. h. an jenem Kohlehydrate, welches offenbar besonders geeignet ist, als Energiequelle zu dienen. Es ergab sich nunmehr die Frage: Vermag sich der Muskel dem wechselnden Bedarfe des Organismus an mobilem Zucker vielleicht durch eine Veränderung seines diastatischen Vermögens anzupassen, etwa in der Art, daß diastatisches Ferment aus einem inaktiven Proferment neugebildet wird, sobald sich beim Hunger oder bei der Arbeit ein Zuckerbedarf einstellt?

Die Frage muß entschieden in verneinendem Sinne beantwortet werden. Es ergab sich kein wesentlicher Unterschied im diastatischen Vermögen, wenn man Muskeln desselben Tieres nach Ruhe oder exzessiver Arbeit, nach dauernd geringer oder hochgradiger funktioneller Beanspruchung (Versuchsreihe VI), nach reichlicher Ernährung oder im Hungerzustande (Versuchsreihe IV) untersuchte. Der Organismus verfügt also sicherlich über andere Hilfsmittel, um seine Kohlehydratvorräte im richtigen Moment nutzbar zu machen.

Eins dieser Hilfsmittel zur Regulierung der Glykogenverzuckerung in den Muskeln darf vielleicht auf Grund meiner Versuche (Versuchsreihe I und II) in der wechselnden Sauerstoffzufuhr durch das Blut vermutet werden. Ergibt sich doch aus diesen Beobachtungen — auch einige Versuche Seegens (l. c.) können in ähnlichem Sinne gedeutet werden —, daß sowohl Sauerstoffzufuhr als auch Blutzusatz den postmortalen Glykogenschwund regelmäßig in wenn auch nicht bedeutender, so doch merklicher Weise steigert, daß diese Steigerung aber bei der Kombination beider Faktoren zuweilen einen sehr erheblichen Grad erreichen kann. Selbstverständlich ist bei der Übertragung einer an einem abgestorbenen Organ gemachten Beobachtung auf den lebenden Organismus die größte Vorsicht geboten; immerhin dürfte aber auf Grund der mit-

geteilten Befunde der Hinweis auf die Möglichkeit nicht unberechtigt erscheinen, daß der Organismus vielleicht in den Regulierungsvorrichtungen für den Zufluß arteriellen Blutes zum Muskel gleichzeitig eine Regulierungsvorrichtung für die im Organismus auf Kosten der Glykogendepots erfolgende Zuckerbildung besitzen könnte. Ob und inwieweit diese Hypothese berechtigt sei, müssen weitere Beobachtungen lehren. Auch soll gleich hinzugefügt werden, daß, selbst wenn weitere Versuche einen Einfluß der wechselnden Sauerstoffzufuhr auf den Glykogengehalt des lebenden Muskels ergeben sollten, man sich hüten müßte, diesen Mechanismus als für die Glykogenverzuckerung einzig und allein oder auch vorzugsweise maßgebend zu betrachten. Sicherlich handelt es sich hier um das Zusammenwirken zahlreicher, uns noch unbekannter Faktoren.

Jedenfalls glauben wir, daß eingehendere Studien über das diastatische Vermögen verschiedener Organe geeignet sein könnten, manche den Kohlenhydratstoffwechsel betreffende Fragen ihrer Lösung näher zu bringen, und es soll zunächst der postmortale Glykogenschwund in den Muskeln in seiner Abhängigkeit von einer Reihe pathologischer Faktoren den Gegenstand systematischer Untersuchungen bilden.

XIV.

Untersuchungen über die Hämolysinbildung.

Von Prof. Dr. **Ivar Bang** und Prof. Dr. **J. Forssman** (Lund, Schweden).

1.

Nachdem Bordet gezeigt hatte, daß die Gesetze, welche für die Wirkungen der spezifischen bakteriolytischen Immunsera gelten, auch für die Auflösung der Blutkörperchen durch die spezifischen hämolytischen Immunsera Gültigkeit besitzen, hat die Lehre der spezifischen Hämolyse eine sehr umfassende Bearbeitung erfahren, und die Bedeutung, welche das Studium der spezifischen hämolytischen Immunsera für den Fortschritt der gesamten Immunitätsforschung gewonnen hat, dürfte allgemein bekannt sein*). Unter den Bearbeitern dieser Fragen stehen neben Bordet Ehrlich und seine Schüler in erster Reihe.

Schon Bordet zeigte, daß die blutauflösende Wirkung eines hämolytischen Immunserums von dem Zusammenwirken zweier Körper bedingt ist, wovon der eine, das Alexin, Ehrlichs Komplement, eine thermolabile Substanz, die in der Regel schon bei 20 Minuten währendem Erhitzen auf 55° zerstört wird, im normalen Serum vorkommt, während der andere, Bordets Sensibiliatrice, Ehrlichs Immunkörper oder Amboceptor, der bei dieser Temperatur noch nicht vernichtet wird, bei dem Immunisierungsprozeß selbst entsteht.

Die Richtigkeit dieser Beobachtungen wird in allen Laboratorien, wo hämolytische Studien betrieben werden, sozusagen täglich be-

*) Da in der letzten Zeit mehrere zusammenfassende Darstellungen über die Lehre der Hämolyse veröffentlicht worden sind, haben wir eine detaillierte Übersicht darüber als überflüssig angesehen und uns im folgenden unter Verweisung auf die betreffenden Originalarbeiten auf die Hervorhebung einiger für unsere Untersuchungen besonders wichtiger Punkte beschränkt.

stätigt. Was aber den Vorgang bei der Auflösung der Erythrocyten durch das hämolytische Serum betrifft, gehen die Auffassungen auseinander. Zwar stimmen sowohl Bordet als Ehrlich darin überein, daß sie beide das Komplement als das eigentlich auflösende Agens betrachten und sehen es als ein Verdauungsferment an [in einer späteren Publikation benutzt Ehrlich*) den vorsichtigeren Ausdruck „fermentähnlich wirkendes“ Komplement], während der Immunkörper (die Sensibilisatrice) die Einwirkung des Komplements auf die Erythrocyten möglich machen soll.

Wie sich dagegen das Zusammenwirken der beiden Körper gestaltet, stellen sich die beiden Autoren verschieden vor. Ehrlich nimmt an, daß es sich hier um eine chemische Bindung handelt und zwar in der Art, daß der Immunkörper, der „Amboceptor“, das Verbindungsglied darstellt, welches sich auf der einen Seite an einen Teil des Erythrocyten, den Receptor, auf der anderen mit dem Komplement verbindet. Wie er sich dies vorstellt, hat Ehrlich mehrmals auseinandergesetzt, durch Beispiele aus der Chemie zu erklären versucht und durch die aus seinen Publikationen wohlbekannten schematischen Figuren illustriert. Bordet dagegen hat sich von einer chemischen Bindung zwischen Alexin und Sensibilisatrice nicht überzeugen können. Er vertritt im Gegenteil die Ansicht, daß es sich nicht um einen chemischen Vorgang im engeren Sinne handelt, sondern daß die Sensibilisatrice wie ein Beizmittel bei dem Färbungsprozeß wirkt. Der Vorgang wäre danach, wie Ehrlich bemerkt, in das Gebiet der „Flächenanziehung und ähnlicher Vorgänge“ einzureihen.

Was die Bildung der beiden Hämolysinbestandteile betrifft, so neigen die meisten Verfasser der Auffassung zu, daß das Komplement von den Leukocyten oder möglicherweise auch anderen Zellen herstammt und daß auch der Immunkörper als ein Sekretionsprodukt der Zellen anzusehen ist. Nur Ehrlich hat es versucht, tiefer in den Mechanismus der Immunkörperbildung einzudringen und erklärt sie bekanntlich mit Hilfe seiner sogenannten Seitenkettentheorie.

Dieser zufolge sind die „Amboceptoren“ überschüssig produzierte und deswegen abgestoßene „Receptoren“, welche im Organismus zirkulieren. Die Ursache dieser Receptorproduktion ist darin zu suchen, daß gewisse Bestandteile der injizierten und später aufgelösten Blutkörperchen eine chemische Verwandtschaft zu den erwähnten Receptoren besitzen, mit denen sie eine Verbindung eingehen.

*) Gesammelte Arbeiten der Immunitätsforschung, S. 12.

Hierdurch werden die Receptoren gesättigt und so zu weiterer Funktion unfähig. Zum Ersatze werden neue Receptoren derselben Art gebildet und zwar kommt es dabei nach Analogie mit anderen Regenerationsformen zu einer Überproduktion an Receptoren.

Diese Theorie fordert also mit absoluter Notwendigkeit, daß ein Körper, welcher eine Amboceptorbildung veranlassen soll, zunächst eine Verbindung mit dem Receptor-Amboceptor eingeht, und es ist danach mit der Ehrlichschen Auffassung unvereinbar, daß ein Körper, dem die Fähigkeit abgeht, sich mit dem Receptor-Amboceptor zu verbinden, eine Amboceptorsekretion bewirkt. Unter diesen Voraussetzungen ist es ohne weiteres klar, welche Bedeutung ein näheres Studium des die Amboceptoren hervorrufenden Substrates für die Hämolysinlehre haben muß. Indessen betreffen bis jetzt mit wenigen Ausnahmen alle Untersuchungen über Lysinbildung und Lysinwirkung die Amboceptoren und die Komplemente, und als wir im Frühjahr 1903 unsere im folgenden mitgeteilten Studien über die amboceptorbildende Funktion begannen, vermißten wir beinahe vollständig jede eingehende Untersuchung hierüber.

Zwar lagen in dieser Richtung Ansätze in betreff der Hämolyse von v. Dungern[1]) und Bordet[2]) vor. v. Dungern zieht aus einigen einschlägigen Versuchen die Folgerung, „daß weder das Hämoglobin noch auch das Stroma die Bildung des Immunkörpers (Amboceptors) bedingt“ und „daß die fragliche Substanz sehr labil sein müsse, denn sie geht schon durch die Behandlung des Blutes mit Wasser und etwas Äther zugrunde“.

Im Gegensatze hierzu zeigte Bordet, daß, wenn man Blutkörperchen im Wasser löst und nachher mit 0,65 Proz. Kochsalzlösung behandelt, die amboceptorbildende Substanz sich in den Stromata vorfindet, eine Tatsache, die auch von späteren Untersuchern bestätigt worden ist, abgesehen davon, daß auch Injektionen von Serum eine Hämolysinbildung hervorrufen (v. Dungern, Tschistovitsch, Morgenroth).

Während der langen Zeit, da wir mit diesen Untersuchungen beschäftigt waren, sind inzwischen zwei kürzere Mitteilungen zu unserer Kenntnis gekommen, in welchen ebenfalls die Frage nach der amboceptorbildenden Substanz, aber nicht für die Erythrocyten, behandelt wird. Bierry und Pettit[3]) haben die lysinogene Substanz — sie halten sie für ein Nukleoproteïd — aus Leber und Nieren von Hunden dargestellt und durch deren Injektion an Kaninchen ein hepatotoxisches bzw. nephrotoxisches Serum erhalten. Auch Vaughan, der seit vielen Jahren die intrazellularen Bakterien-

toxine studiert, hat das Lysinogenproblem berührt. Aus dem kurzen Referate[4]), welches uns beim Niederschreiben dieser Arbeit zur Verfügung steht, geht hervor, daß Vaughan, der schon 1904[5]) mitgeteilt hat, daß er die Bakteriensubstanz durch Einwirkung von 2 proz. alkoholischer Natronlösung in einen alkohollöslichen, stark toxischen und einen atoxischen, alkoholunlöslichen Teil aufteilen konnte, durch Injektion des letztgenannten Teiles, der wasserlöslich ist, bakteriolytische Sera erhielt.

Mit diesen Mitteilungen ist unsere Kenntnis von den Eigenschaften der lysinogenen Substanz erschöpft.

Als wir an die vorliegende Untersuchung gingen, geschah es in der Überzeugung, daß es uns in verhältnismäßig kurzer Zeit gelingen dürfte, die die Hämolyse betreffenden Fragen klarstellen und dann an die Erforschung der Cytolyse und Bakteriolyse gehen zu können. Bald erwiesen sich jedoch die Schwierigkeiten unserer Aufgabe als viel größer und das Problem als viel verwickelter, als wir gedacht hatten. Infolgedessen ist auch unsere Arbeit nur langsam fortgeschritten und wenn wir jetzt im Januar 1906 zu einem gewissen Abschluß unserer Untersuchungen über das Hämolysin gekommen sind, so ziehen wir es vor, eine Übersicht dieser Untersuchungen mitzuteilen, ohne die Resultate unserer schon im Gange befindlichen Arbeiten über die anderen Lysine abzuwarten.

2. Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der lysinogenen Substanz der Blutscheiben.

a) Die Zusammensetzung der Blutscheiben mit besonderer Berücksichtigung der Lipoidstoffe.

Die roten Blutkörperchen können als eine Hämoglobinlösung angesehen werden, die von dem Stroma umschlossen wird. Andere Auffassungen über die Struktur derselben sind minder wahrscheinlich, weshalb wir hier davon absehen können. Soviel ist sicher, daß Hämoglobin und Stroma die zwei wesentlichen Hauptbestandteile ausmachen.

Da wir nun weiter aus Bordets obenerwähnten Untersuchungen wissen, daß bei Injektionsversuchen das Hämoglobin unwirksam und die Stromata wirksam sind, ist es klar, daß wir die Substanzen, welche die Hämolysinbildung veranlassen, unter den Stromabestandteilen zu suchen haben.

Von diesen Stromabestandteilen sind außer Salzen und Wasser Eiweißkörper und Extraktivstoffe bekannt. Warum die Extraktivstoffe

zuerst unsere Aufmerksamkeit in Anspruch nahmen, geht aus der folgenden Betrachtung hervor.

Die bedeutungsvollste Eigenschaft der Stromamembran ist unzweifelhaft die Semipermeabilität derselben. Nach den Untersuchungen von Nernst, Overton, H. Meyer und anderen ist die Permeabilität der semipermeablen Membranen von der Löslichkeit der betreffenden Substanz in der Membran abhängig. Die Substanz diffundiert zuerst in die Membran zu einer festen Lösung (van 't Hoff) und weiter ins Innere der Zellen — im vorliegenden Falle der Blutscheiben — bis das von dem Teilungskoeffizienten bedingte Gleichgewicht der Konzentration der Substanz in der Membran und in dem äußeren und inneren Medium erreicht ist. Durch die Bestimmung des Teilungskoeffizienten für verschiedene Stoffe hat bekanntlich Overton gefunden, daß die Plasmahaut der Pflanzen- und Tierzellen für alle Körper, welche in Fetten löslich sind, permeabel ist und weiter, daß eine Reihe Substanzen, welche nicht fettlöslich sind, nichtsdestoweniger durch die Plasmahaut diffundieren können. Hieraus zieht Overton den Schluß, daß die Plasmahaut nicht aus Fett, sondern aus fettähnlichen Stoffen — Lipoidstoffen — darunter Cholesterin und Lecithin, besteht.

Die Bedeutung dieses von vielen bestätigten Fundamentalsatzes ist allgemein bekannt und braucht hier nicht weiter erörtert zu werden.

Wenn aber die der Diffusion fähigen Substanzen in den Lipoidstoffen der Blutkörperchen löslich sind, müssen umgekehrt auch die Lipoidstoffe in diesen Körpern löslich sein; dies ist auch der Fall. Chloroform, Äther, Amylen, Alkohol, Aceton, Petroläther u. a. lösen die Lipoidstoffe der Plasmahaut so, daß nach Auflösung der Begrenzungsmembran das Hämoglobin austritt; das Blut wird lackfarben, hämolysiert.

b) Die Rolle der Lipoidstoffe bei der biologischen Hämolyse.

Die genannten Hämolytica sind allgemein wirksam, sie lösen die Erythrocyten der verschiedensten Blutarten im Gegensatze zu dem artspezifischen biologischen Hämolysin, welches nur die Erythrocyten einer bestimmten Blutsorte aufzulösen vermag.

Wenn man aber annehmen will, daß auch das spezifische Hämolysin die Hämolyse durch Einwirkung auf die Plasmahaut bewirkt, läßt die Spezifizität sich vielleicht so erklären, daß sich unter den Lipoidstoffen auch artspezifische befinden, welche mit dem

spezifischen Hämolysin reagieren. Eine solche Möglichkeit ist a priori nicht von der Hand zu weisen; im Gegenteile, manche Tatsachen deuten darauf hin, daß das Hämolysin mit der Plasmahaut reagiert, um die Hämolyse zu bewirken, z. B. die Fixation des Amboceptors auf den Blutkörperchen.

Diese Betrachtung war der Ausgangspunkt unserer Untersuchung, welche also zur Aufgabe hatte, festzustellen, ob die Lipoidstoffe bei der Hämolyse und Hämolysinbildung eine Rolle spielten.

Diese Aufgabe ist der experimentellen Bearbeitung zugänglich. Als supponierter Lipoidstoff mußte nämlich der artspezifische „Receptor" — um die Ehrlichsche Terminologie zu benutzen — in den allgemein wirksamen Hämolytica löslich sein. Und da nun weiter nach Ehrlich die Receptoren auch im Versuchstier die Hämolysinbildung veranlassen, brauchte man nur die Lipoidstoffe der Blutkörperchen zu extrahieren und das Extrakt den Versuchstieren einzuspritzen. War unsere Voraussetzung richtig, mußte man auch in diesem Falle ein artspezifisches Hämolysin bekommen.

Schon unsere ersten Versuche ergaben eine unzweideutige Bestätigung dieser Vorstellung. Damit war unsere Auffassung im Prinzip als richtig festgestellt und zugleich der erste Schritt zur Lösung der gestellten Aufgabe gemacht.

c) Versuchsanordnung.

Die Methodik, deren wir uns bedienten, war die folgende:

In den meisten Versuchen — in allen, wo nichts anderes angegeben ist — benutzten wir Ochsenblut. Die Blutkörperchen wurden durch Zentrifugieren von Serum befreit und mehrmals mit 0,8proz. Kochsalzlösung ausgewaschen. Als Extraktionsmittel haben wir, wo nicht ausdrücklich anderes bemerkt wird, Äther angewendet. Man erzielt so zwar keine quantitative, aber doch eine ganz zufriedenstellende Ausbeute an Lipoidstoffen.

Etwa 1 Liter Blutkörperchenbrei wurde mit etwa 2 Liter Äther im Schüttelapparate durch 2 Stunden kräftig geschüttelt, der Äther entfernt und das Ausschütteln in gleicher Weise wiederholt, bis man das Blut mit im ganzen etwa 8 Liter Äther — also 4- bis 6mal — behandelt hatte. Der Ätherauszug wurde dann bis auf 2 Liter eingeengt, da wir eine Lösung bevorzugten, die der Menge nach dem ursprünglichen Blutquantum entsprach. Anfangs setzt sich der Äther oft schlecht ab. Durch Zusatz von ein wenig Alkohol geht zwar die Emulsion zurück, doch haben wir es vorteilhafter gefunden, mehr Äther hinzuzufügen und leise zu schütteln. Die geringe Ätherschicht wird abpipettiert, dann

neuer Äther hinzugefügt usw., bis sich nach und nach die Flüssigkeiten trennen.

Wir haben untersucht, ob man bequemer die Extraktion mit kochendem Äther vornehmen kann. Dies ist aber nicht der Fall.

Auch ist es nicht vorteilhafter, eingetrocknete Blutkörperchen zur Extraktion zu benutzen.

Das ursprüngliche Ätherextrakt ist bernsteingelb gefärbt und klar. Das konzentrierte Extrakt enthält einen geringen weißen Niederschlag.

Zu den Injektionsversuchen wurden etwa 50 bis 100 ccm des konzentrierten Ätherextraktes bei gewöhnlicher Temperatur eingetrocknet (wir haben hierzu mit Vorteil eine Ventilationseinrichtung benutzt) und das Residuum, welches weißgelb, salbenartig ist und einen eigentümlichen, aromatischen Geruch besitzt, mit 10 bis 15 ccm 0,8proz. Kochsalzlösung angerührt, den Versuchstieren — immer Kaninchen — intraperitoneal beigebracht. Nach einer Woche gaben gewöhnlich etwa 0,2 bis 0,3 ccm des Kaninchenserums mit 2 ccm 5proz. Ochsenblut versetzt totale Hämolyse.

Wenn mehrere Einspritzungen folgten, wurden sie immer in achttägigen Perioden ausgeführt.

Da es sich bald herausstellte, daß die lysinogene Substanz coctostabil ist, haben wir die Injektionslösungen immer erst aufgekocht und die Einspritzungen nach Abkühlung auf Körpertemperatur vorgenommen.

Wir finden es überflüssig, die Versuche über die Hämolysinbildung nach Injektion von Ätherextrakt ausführlicher mitzuteilen, da erstens alle später angeführten Versuche von dem Ätherextrakt ausgehen, und zweitens jedermann das Versuchsresultat leicht kontrollieren kann. Man erhält beinahe konstant ein positives Resultat. (Nur in einem Falle, Kaninchen Nr. 18, ist nach einigen Injektionen die Hämolysinbildung ausgeblieben, was übrigens auch bei Verwendung von Blutkörperchen vorkommen kann.)

Wie erwähnt, benutzten wir gewöhnlich etwa 50 bis 100 ccm des Ätherextraktes, was etwa demselben Volum Vollblut entspricht. Es gelingt allerdings auch, mit Ätherextrakt von kleineren Blutquantitäten Hämolysin zu erzeugen. So haben wir in einem Versuche Blutkörperchen von nur 7,5 ccm Blut mit Äther extrahiert, das eingedampfte, in 0,8proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmte Extrakt injiziert (Kaninchen 44), und erhielten hierdurch eine so kräftige Hämolysinbildung, daß 0,1 ccm vom Serum des Tieres in Mischung mit 0,5 ccm normalem Kaninchenserum totale Hämolyse von 2 ccm 5proz. Ochsenblut gab. In diesem Falle wurde aber die Ätherbehandlung bedeutend länger als gewöhnlich fortgesetzt und die Extraktion der lysinogenen Substanz war dementsprechend vollständiger. Bei dem von uns gewöhnlich angewandten Verfahren wird nämlich die gesuchte Substanz auch nicht annäherungsweise vollständig ausgezogen. Aus diesem Grunde verwendeten wir größere

Quantitäten Ätherextrakt zur Injektion, um sicher zu sein, eine genügende Menge der Substanz beizubringen.

Wie aus den Bordetschen Untersuchungen hervorgeht, findet sich die Substanz in den Stromata, und wir haben auch durch Ätherextraktion von solchen, nach Bordets Methode dargestellten Stromata hämolysinerzeugende Extrakte bekommen.

In einigen Fällen haben wir auch ganz trockene, nach Pascucci dargestellte Stromata im Soxhletapparat mit Äther extrahiert und auf diese Weise ein sehr konzentriertes und dementsprechend sehr wirksames Extrakt bekommen. Solche Extrakte enthalten ferner weniger Verunreinigungen als die direkt aus Blut dargestellten. Leider scheinen sie viel weniger haltbar zu sein. Schon nach 2 bis 3 Wochen waren sie beinahe ganz unwirksam geworden (nach mehreren Injektionen keine Hämolysinbildung, während das frisch bereitete Extrakt nach einer Injektion totale Hämolyse gab). Das Ätherextrakt aus Blut ist dagegen wenigstens ein halbes Jahr wirksam, obwohl sich wahrscheinlich die aktive Substanz mit der Zeit in chemischer Beziehung ändert, da sie die Löslichkeit in den spezifischen Lösungsmitteln (Benzol) einbüßt.

Obwohl sich also auch altes Ätherextrakt wirksam erwiesen hat, würden wir doch raten, immer frisches zu benutzen.

Wir glauben übrigens, daß es vorteilhaft ist, die Extrakte nur aus Blut von eben geschlachteten Tieren zu bereiten. Zwar haben wir auch aktive Extrakte aus Blut erhalten, das 8 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war, hatten aber dabei mehrfach Mißerfolge zu verzeichnen.

d) Identität des durch Ätherextrakt erzeugten Hämolysins mit dem durch Blutkörperchen hervorgerufenen.

Auf Grund der obenerwähnten Versuche war anzunehmen, daß das durch Injektion des Ätherextraktes erhaltene Hämolysin mit dem durch Injektion von Erythrocyten selbst erhaltenen identisch ist. Durch einige darauf gerichtete Versuche suchten wir uns darüber Gewißheit zu verschaffen.

Hierbei zeigte sich sofort, daß das Hämolysin von Tieren, welche Ätherextrakt bekommen hatten (solche Sera werden im folgenden als „Äthersera" bezeichnet werden), ebenso wie das Hämolysin gewöhnlicher hämolytischer Sera („Blutkörperchensera") aus zwei Komponenten, Komplement und Immunkörper, bestand. So ließ sich aus einem gegen Ochsenblutkörperchen wirksamen Atherserum der Immunkörper in der Kälte mit Ochsenblutkörperchen niederreißen. Durch halbstündiges Erwärmen auf 55° wurde es inaktiviert (in einigen Fällen Inaktivierung schon bei 40 Minuten langem Erwärmen auf 50°). Inaktiviertes Serum wurde von Normalserum reaktiviert. Diese Reaktivierung ließ sich auch nach einem 40 Minuten währenden Erwärmen auf 70° sowohl bei

den Äthersera wie auch bei den gewöhnlichen hämolytischen Sera nachweisen. Beide Arten von Serum wurden bei Aufbewahrung spontan nach einiger Zeit unwirksam.

Auch in anderer Beziehung verhielten sich die Sera identisch. Wie bekannt, ist die Spezifizität der hämolytischen Sera nur eine relative. Außer den Erythrocyten, auf welche sie eingestellt sind, lösen sie auch jene anderer Tierarten, am besten die von verwandten Tierspezies. Es wurden daher mit für Ochsenblutkörperchen eingestellten Äthersera und Blutkörperchensera Parallelversuche betreffs ihrer Einwirkung auf Erythrocyten von Ochs, Schaf, Schwein und Pferd angestellt. In nachstehender Tabelle sind die Resultate einer solchen Versuchsserie zusammengestellt.

Versuchsserie Nr. 1.

Um die Stärke der Hämolyse in jedem einzelnen Falle zu charakterisieren, werden in diesem und allen folgenden Versuchen die nebenstehenden Bezeichnungen angewandt:

0 = keine Hämolyse;
\+ = schwache Hämolyse;
++ = kräftige Hämolyse;
+++ = fast totale Hämolyse, nur wenig ungelöste Blutkörperchen;
++++ = totale Hämolyse.

Überall, wo nichts anderes bemerkt ist, sind 2 ccm 5proz. Aufschwemmungen von mit 0,8proz. Kochsalzlösung gewaschenen Blutkörperchen in gleicher Kochsalzlösung für die Hämolyseversuche benutzt.

Die Sera 8 und 44 sind gewöhnliche hämolytische Sera, durch Injektion von Ochsenblutkörperchen gewonnen; die Sera 10, 34 und 38 sind ätherhämolytische Sera.

1.	0,4 ccm	Ser. 8	+	0,3 Norm.-Kaninserum	+	2 ccm	Ochsenblut	+++
2.	0,4 „	Ser. 10	+	„ „ „	+	„	„	++
3.	0,4 „	Ser. 8	+	„ „ „	+	„	Schafblut	+++
4.	0,4 „	Ser. 10	+	„ „ „	+	„	„	++
5.	0,4 „	Ser. 8	+	„ „ „	+	„	Schweineblut	0
6.	0,4 „	Ser. 10	+	„ „ „	+	„	„	0
7.	0,4 „	Ser. 8	+	„ „ „	+	„	Pferdeblut	+
8.	0,4 „	Ser. 34	+	„ „ „	+	„	Ochsenblut	+++
9.	0,2 „	„	+	„ „ „	+	„	„	++
10.	0,05 „	„	+	„ „ „	+	„	„	+
11.	0,4 „	„	+	„ „ „	+	„	Schafblut	+++
12.	0,2 „	„	+	„ „ „	+	„	„	++
13.	0,05 „	„	+	„ „ „	+	„	„	+
14.	0,4 „	„	+	„ „ „	+	„	Schweineblut	0
15.	0,2 „	„	+	„ „ „	+	„	„	0
16.	0,05 „	„	+	„ „ „	+	„	„	0
17.	0,4 „	„	+	„ „ „	+	„	Pferdeblut	+
18.	0,2 „	Ser. 38	+	„ „ „	+	„	Ochsenblut	+++

19.	0,1 ccm	Ser. 38	+	0,3	Norm.-Kaninserum		+	2 ccm	Ochsenblut	++
20.	0,05 „	„	+	„	„	„	+	„	„	+
21.	0,2 „	„	+	„	„	„	+	„	Schafblut	+++
22.	0,1 „	„	+	„	„	„	+	„	„	++
23.	0,05 „	„	+	„	„	„	+	„	„	+
24.	0,2 „	„	+	„	„	„	+	„	Schweineblut	0
25.	0,1 „	„	+	„	„	„	+	„	„	0
26.	0,05 „	„	+	„	„	„	+	„	„	0
27.	0,2 „	Ser. 44	+	„	„	„	+	„	Ochsenblut	++++
28.	0,05 „	„	+	„	„	„	+	„	„	++
29.	0,2 „	„	+	„	„	„	+	„	Schafblut	+++
30.	0,05 „	„	+	„	„	„	+	„	„	++
31.	0,2 „	„	+	„	„	„	+	„	Schweineblut	0
32.	0,05 „	„	+	„	„	„	+	„	„	0
33.	0,2 „	„	+	„	„	„	+	„	Pferdeblut	+++

Der Grad der Hämolyse in diesen und allen folgenden Versuchen ist in der Weise bestimmt, daß die gleich großen Proben nach einstündiger Aufbewahrung im Thermostaten und 24stündigem Stehen im Eisschrank miteinander vor einem weißen Papier verglichen wurden. Diese Methode läßt ja keine sehr feine Abschätzung zu, aber man erhält doch, wie wir gesehen haben, sehr gute und jedenfalls für unsern Zweck genügend genaue Resultate. Aus der Unvollkommenheit der Methode läßt sich erklären, daß die Sera 8, 10, 34 und 38 dieselbe Wirkung gegenüber Ochsen- und Schafblut zeigen, trotzdem die Kaninchen, von welchen die Sera herstammten, mit Ochsenblut bzw. Ätherextrakt von Ochsenblut immunisiert worden waren. Erneute Versuche mit kleinen Serumquantitäten, welche nur schwache Hämolyse bewirkten, ergaben jedoch dasselbe Resultat, weshalb die Differenz zwischen der Einwirkung dieser Sera auf Ochsen- und Schafblut jedenfalls nicht groß gewesen sein kann. Indessen haben nicht alle hämolytischen Sera von mit Ochsenblut behandelten Kaninchen dieselbe relative hämolytische Wirkung auf verschiedene Blutsorten, und das gilt auch für die Äthersera. Beim Vergleich der Wirkung von Serum 8 und 44 auf Blut von Ochs, Schaf und Pferd geht das deutlich hervor. Solche Beobachtungen, wo die Differenzen außerhalb der Beobachtungsfehler lagen, haben wir mehrfach gemacht.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen können wir auf Grund unserer Versuche die hämolytische Wirkung der Äthersera jener der gewöhnlichen hämolytischen Sera gleichstellen und das Hämolysin der beiden Serumarten für identisch erklären.

e) Die Lipoide der Blutscheiben.

Nachdem gefunden war, daß die hämolysinbildende Wirkung der Erythrocyten eine Funktion ihrer Lipoidstoffe ist, stellten wir uns als nächste Aufgabe, zu untersuchen, ob die Substanz mit einem der bekannten Lipoidstoffe identisch ist oder ob sie einen neuen noch unbekannten chemischen Körper darstellt, dessen Individualität

dann festzustellen war. Eine solche Untersuchung setzt die Kenntnis der Lipoidstoffe im allgemeinen, im besonderen aber der Lipoide der Erythrocyten voraus.

Leider ist unsere chemische Kenntnis der Lipoidstoffe sehr unvollständig und, was noch schlimmer ist, die einschlägigen Angaben sind so widersprechend, daß man überhaupt nur auf wenig sicher bewiesene und allgemein anerkannte Tatsachen stößt. Besonders trifft dies für die Phosphatide zu. Die Ursache hiervon liegt in der großen Schwierigkeit derartiger Untersuchungen.

Die Hauptfundstelle der Lipoidstoffe ist das Gehirn, wo sie sowohl an Zahl und Menge stärker vertreten sind als anderswo im Tierkörper. Unsere Kenntnis der Lipoidstoffe bezieht sich denn auch vorwiegend auf die im Gehirne vorkommenden Verbindungen.

Von den zahlreichen Untersuchungen über Gehirnchemie sind unzweifelhaft jene Thudichums[6]) die hervorragendsten. Ein Teil von Thudichums Resultaten ist auch von späteren Forschern bestätigt worden (Koch, Thierfelder, Hammarsten u.a.), obwohl er sich in manchem Punkte geirrt zu haben scheint. Soviel darf man wohl in Übereinstimmung mit Thudichum sagen, daß der früher im Vordergrund stehende Protagonbegriff jedenfalls unrichtig ist — trotzdem ihn noch einzelne Autoren aufrecht halten — und daß man dagegen mit Thudichum mehr oder weniger scharf gekennzeichnete Gruppen von Stoffen zu unterscheiden hat und zwar als erste und wichtigste Gruppe die der N- und P-haltigen Phosphatide, als zweite die der P-freien, N-haltigen Cerebroside-Cerebrinacide, als dritte die der phosphor- und stickstofffreien „lipoiden" Bestandteile (Fett und Cholesterin usw.), und als vierte die der sogenannten organoplastischen Substanzen (Eiweißkörper und deren Abkömmlinge usw.). Hierzu kommen ferner Salze und Wasser, die uns hier nicht interessieren. Wir haben im großen und ganzen diese Einteilung Thudichums acceptiert, ohne uns jedoch hiermit so streng an Thudichums Auffassung zu binden, daß wir nicht auch andere Auffassungen berücksichtigen könnten, wie man unten sehen wird.

Es fragt sich nun, welche von den Hauptgruppen der Lipoidstoffe in den Blutkörperchen vertreten sind. Von Phosphatiden ist seit langem das Lecithin in den Erythrocyten bekannt. Ein anderes Phosphatid, das Amidomyelin, ist hier von Thudichum nachgewiesen. Wie man erwarten konnte, enthalten die Blutkörperchen außerdem noch mehrere Phosphatide und es ist uns auch mittels Thudichums Chlorcadmiumverfahren gelungen, noch zwei weitere

Gehirnphosphatide zu isolieren: ein Kephalin und einen wahrscheinlich mit dem Sphingomyelin identischen Körper. Auch Vertreter der zweiten Gruppe — Cerebroside — kommen nach unseren Erfahrungen in den Blutkörperchen vor. Solche sind übrigens in der letzten Zeit hier auch von Pascucci[7]) nachgewiesen worden.

Daß Stoffe der dritten Gruppe in den Erythrocyten vorkommen, ist bekannt. Cholesterin ist hier als konstanter Bestandteil und zwar in reichlicher Menge vertreten. Dagegen wird bestritten, daß hier auch Neutralfett bzw. Fettsäuren vorkommen. Nach unseren Erfahrungen fehlen sie jedoch nicht.

Man könnte vielleicht a priori annehmen, daß die vierte Gruppe, die der organoplastischen Bestandteile, im Ätherextrakte nicht vertreten ist und daher für uns kein Interesse darbietet. In der Tat enthält aber das Ätherextrakt solche Substanzen in nicht unerheblicher Menge.

Übrigens mußte man darauf gefaßt sein, daß neben diesen relativ wohl charakterisierten Körpern noch andere unbekannte Stoffe vorkommen und daß die lysinogene Substanz vielleicht gerade zu diesen gehöre.

f) Charakterisierung der lysinogenen Substanz als Lipoidstoff.

Von diesen Gesichtspunkten ausgehend haben wir nun, um die Natur der lysinogenen Substanz aufzuklären, zuerst untersucht, welcher Hauptgruppe der Lipoide sie angehört.

Wir suchten deswegen vor allem nach Gruppenreagenzien, um die Hauptgruppen der Lipoidstoffe zu charakterisieren und voneinander zu trennen. Solcher Gruppenreagenzien gibt es aber leider nur sehr wenige; auch ließ sich eine scharfe Scheidung a priori kaum erwarten, da die Lipoidstoffe sich gegenseitig, aber auch andere heterogene Stoffe in bezug auf Löslichkeit erheblich beeinflussen, wie z. B. für Lecithin dem Traubenzucker gegenüber bekannt ist.

Wir benutzten als Gruppenreagens zuerst Aceton, welches die Substanzen der dritten Gruppe, nicht aber der ersten, zweiten und vierten aufzulösen vermag.

Die Acetonextraktion wurde in der Weise ausgeführt, daß das eingetrocknete Ätherextrakt z. B. aus 150 ccm Blut mit 30 bis 40 ccm Aceton verrieben und nach gründlichem Schütteln zentrifugiert wurde. Die klare gelbgefärbte Acetonlösung wurde abpipettiert, das Residuum mit neuem Aceton versetzt, zentrifugiert usw., bis im ganzen etwa 100 bis 150 ccm Aceton zur Verwendung gekommen waren.

Dasselbe Verfahren haben wir bei unseren Versuchen immer benutzt, wenn wir untersuchten, inwieweit die lysinogene Substanz in einem Lösungsmittel bei gewöhnlicher Temperatur löslich ist oder nicht, und sehen deshalb im folgenden von einer nochmaligen Beschreibung der Methodik ab. Die Acetonextraktion wurde fortgesetzt, bis wir in entnommenen Proben mit Salkowskis Cholesterinreaktion nach 12 Stunden kein positives Ergebnis mehr erhielten. Um dies zu erzielen, mußten wir die Extraktion im Schüttelapparate mehrmals viele Stunden lang fortsetzen.

Die gesammelten, auf diese Weise erhaltenen Acetonlösungen wurden bei gewöhnlicher Temperatur zur Trockne gebracht und der Rückstand, sowie auch der acetonunlösliche Teil mit 10 bis 15 ccm 0,8proz. Kochsalzlösung angerührt, aufgekocht und den Versuchskaninchen eingespritzt.

Bei der später vorgenommenen Prüfung der Kaninchensera zeigte sich, daß die Sera der Tiere, welche die acetonunlösliche Fraktion erhalten hatten, hämolytische Wirkung aufwiesen, während die anderen Sera, obwohl die Tiere eine ganze Serie Injektionen der acetonlöslichen Substanzen bekommen hatten, nie die Spur einer Hämolysinbildung ergaben.

Die betreffenden Tierversuche anzuführen, sehen wir als überflüssig an, da alle späteren Versuche von dem acetonunlöslichen Teil des Ätherextraktes ausgehen.

Die lysinogene Substanz findet sich also immer in der acetonunlöslichen Fraktion — im „Acetonreste". Hiermit ist ausgeschlossen, daß sie mit Cholesterin, Neutralfett oder Fettsäuren identisch ist.

Bevor wir dazu übergingen, den „Acetonrest" der Einwirkung der anderen „Gruppenreagenzien" zu unterwerfen, untersuchten wir zuerst die Beziehung desselben zu Äther. Denn obwohl wir ursprünglich die lysinogene Substanz durch Äther ausgezogen hatten, war damit nicht bewiesen, daß sie auch im engeren Sinn ätherlöslich ist. Denn einmal haben mehrere Beobachter auf die verschiedene Löslichkeit der Lipoidstoffe wasserfreiem oder wasserhaltigem Äther gegenüber aufmerksam gemacht, und in unserem Versuche hatte der Äther sicher bei Berührung mit dem wasserhaltigen Blute Wasser aufgenommen. Sodann ist, wie schon oben bemerkt wurde, bekannt, daß die Löslichkeit der Lipoidstoffe von Lösungsgenossen in hohem Maße beeinflußt wird.

Wir haben daher den wirksamen Acetonrückstand mit Äther extrahiert, wobei ein sehr bedeutender Teil unlöslich zurückblieb. Sowohl der Trockenrückstand der Ätherlösung als auch der unlösliche Anteil wurden Tieren eingespritzt. Nach einigen Injektionen bewirkte

das Serum des Tieres, das die unlösliche Fraktion bekommen hatte, Hämolyse, während der ätherlösliche Teil sich als unwirksam erwies.

Nach unseren Versuchen ist diese Änderung der Löslichkeit im Äther nicht seinem Wassergehalte zuzuschreiben, denn einerseits beobachteten wir, daß das ursprüngliche, ganz eingetrocknete Ätherextrakt auch im wasserfreien Äther vollständig löslich war, andererseits erhielten wir auch durch Extraktion wasserfreier nach Pascuccis Methode dargestellter Stromata mit wasserfreiem Äther ein Extrakt, dessen Injektion Hämolysinbildung hervorrief (nach einer Injektion totale Hämolyse).

Die Löslichkeit der lysinogenen Substanz im Äther wird demgemäß durch die Anwesenheit acetonlöslicher Körper vermittelt. Werden diese Stoffe vorher mit Aceton beseitigt, so geht die Ätherlöslichkeit verloren.

Diese relative Ätherlöslichkeit veranlaßte uns zunächst zu untersuchen, ob etwa die aktive Substanz der vierten Gruppe — den organoplastischen Stoffen, Eiweißkörpern, Fermenten und fermentähnlichen Stoffen — angehört, da gerade diese Körper durch Lipoidstoffe eine relative Löslichkeit besonders in Äther erhalten können.

Als Gruppenreagens der vierten Gruppe haben wir Benzol eingeführt. Behandelt man den durch Trocknen vollständig wasserfrei gewordenen Acetonrückstand mit Benzol, so gehen die Substanzen der zweiten und dritten Gruppe in Lösung, während die organoplastischen Substanzen nicht gelöst werden. Wir behandelten also den Acetonrückstand einerseits mit kaltem, andererseits mit kochendem Benzol.

Die Benzolextraktion in der Kälte wurde in der oben bei der Acetonextraktion erwähnten Weise ausgeführt. Bei Extraktion in der Wärme wurde der Acetonrückstand (100 ccm Blut entsprechend) mehrere Male mit 30 bis 40 ccm, im ganzen mit etwa 100 bis 150 ccm Benzol ausgekocht. Die Benzollösung wurde heiß filtriert; sie war bernsteingelb gefärbt und setzte auch nach dem Erkalten keinen Bodensatz ab. Die Menge der in Benzollösung übergehenden Stoffe war gering, die Substanz blieb größtenteils in der unlöslichen Fraktion zurück.

Nachdem der in Benzol unlösliche Teil ganz von Benzol befreit war und die Benzollösungen mit Hilfe der Ventilationsvorrichtung eingetrocknet worden waren, wurde der Rückstand, in 10 bis 15 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, den Versuchstieren eingespritzt. Je eine Serie von 12 Kaninchen erhielt 3 Injektionen der benzollöslichen bzw. der benzolunlöslichen Fraktion.

Von den Tieren, welchen die Fraktionen der kalten Benzolextraktion eingespritzt worden waren, wiesen jene ein hämolytisches

Serum auf, welche den benzolunlöslichen Teil erhalten hatten, nicht aber jene, denen der benzollösliche Teil beigebracht worden war. Diese Tatsache steht in Übereinstimmung mit einer Versuchsserie, die wir mit dem Benzolextrakt des ursprünglichen, durch Trocknen vollständig vom Wasser befreiten Ätherextraktes ausführten. Auch hier war die benzollösliche Fraktion ganz unwirksam, während der benzolunlösliche Teil dagegen sehr oft, obwohl nicht immer, Hämolysinbildung bewirkte.

Bei der Prüfung der mit kochendem Benzol dargestellten Fraktionen erhielten wir das entgegengesezte Ergebnis. Hier zeigten nämlich die Tiere, die Injektionen der benzollöslichen Fraktion bekommen hatten, Hämolysinbildung, die anderen nicht. Daraus folgt, daß die lysinogene Substanz in kaltem Benzol unlöslich, in kochendem dagegen löslich ist, und daß sie dann auch nach dem Erkalten in Lösung bleibt.

Da die in kochendem Benzol lösliche Fraktion des Acetonrückstandes zu den weiter unten erwähnten Versuchen über die Eigenschaften der lysinogenen Substanz benutzt worden ist und, da diese Versuche etwa 80 Kaninchen umfaßten, so waren wir gezwungen, bedeutende Quantitäten der Benzollösung zu bereiten. Hierbei sind wir vielen Schwierigkeiten, welche wir an dieser Stelle erwähnen möchten, begegnet.

Zuerst ist zu bemerken, daß wir bei der Bereitung des Acetonrestes mit kochendem Benzol in ein paar Fällen ein vollkommen unwirksames Extrakt erhielten. In der Regel bewirkte jedoch die erhaltene Benzollösung (etwa 100 ccm Blut entsprechend) nach dem Trocknen, Aufschwemmen in 0,8 proz. Kochsalzlösung und Injektion starke Hämolysinbildung. In einzelnen Versuchen war übrigens die Benzollösung bedeutend wirksamer. Eine solche sehr wirksame Lösung, welche uns in reichlicher Menge zur Verfügung stand, war für uns von besonderem Wert, weil sie 3 Monate unverändert wirksam blieb. So dauerhaft sind die Lösungen jedoch gewöhnlich nicht; oft werden sie schon nach kurzer Zeit schwächer. Will man deswegen dieselbe Benzollösung längere Zeit benutzen, so muß man sie von Zeit zu Zeit auf ihre Wirksamkeit prüfen.

Durch die Benzolextraktion war die Antwort auf die früher gestellte Frage gegeben. Die lysinogene Substanz konnte als ein in kochendem Benzol löslicher Körper unmöglich ein Eiweißkörper, ein Ferment oder eine fermentähnliche Substanz sein.

Bei mikroskopischer Untersuchung des Rückstandes der mit kochendem Benzol erhaltenen Lösung fanden sich reichlich an Cholesterin erinnernde Kristalle.

Dies war sehr unerwartet, da eine gründliche Acetonextraktion vorhergegangen war. Wir erneuerten nun deswegen die Acetonbehandlung und fanden zu unserer Überraschung, daß sich wieder

ein nicht unerheblicher Teil der eingetrockneten Benzollösung durch Aceton extrahieren ließ. Auch hier bleibt die lysinogene Substanz in der acetonunlöslichen Fraktion, während der acetonlösliche Teil in einer ganzen Serie von Injektionen keine Hämolysinbildung veranlaßte.

Diese Tatsache wurde durch 4 Tierversuche (Nr. 56, 57, 65 und 66) sichergestellt. Bei diesen wurden einerseits (Nr. 56 und 65) die acetonunlöslichen, andererseits (Nr. 57 und 66) die entsprechenden acetonlöslichen Stoffe des Benzolrückstandes eingespritzt. In beiden Serien war das Ergebnis dasselbe: Nach zwei Injektionen bewirkte das Serum der Tiere, welche den unlöslichen Teil bekommen hatten, totale Hämolyse, während die anderen Tiere — auch nach zwei Injektionen — kein Hämolysin gebildet hatten.

Der aktive acetonunlösliche Teil der eingetrockneten Benzollösung dürfte die Körper der Gruppe 1 und 2 — Phosphatide und Cerebroside — enthalten. Daneben war das Vorhandensein davon verschiedener Substanzen anzunehmen. Selbstverständlich gingen unsere Bestrebungen vor allem dahin, zu erfahren, ob die lysinogene Substanz der ersten oder zweiten Gruppe angehöre und ob sie in solchem Falle einem schon bekannten chemischen Körper entspreche. Wir haben auf diesen Punkt, besonders auf die Untersuchung der Blutphosphatide mit Rücksicht auf ihre eventuelle Bedeutung für die Hämolysinbildung, viel Arbeit verwandt.

Bekanntlich bestehen die Phosphatide, als deren typischer Repräsentant Lecithin anzusehen ist, aus einer Phosphorsäure, welche mit einem Alkohol, einer Base und Fettsäuren verbunden ist. Da sämtliche letztgenannten Komponenten variieren können, so ist klar, daß eine große Zahl von Phosphatiden denkbar ist. In der Tat sind auch verschiedene solche von Thudichum im Gehirne gefunden worden. Diese Befunde Thudichums werden von vielen Forschern bestritten, welche im Gegensatze zu der pluralistischen Auffassung Thudichums behaupten, daß das Gehirn, das Lecithin ausgenommen, hauptsächlich nur ein einziges Phosphatid, das Protagon, enthält. Dieselben nehmen auch an, daß das wichtigste Cerebrosid einen Bestandteil des Protagons bildet, während Thudichum die Existenz zahlreicher präformierter Cerebroside und Cerbrinacide verteidigt. Obwohl wir uns prinzipiell der pluralistischen Auffassung Thudichums anschließen, hat dies doch nicht im geringsten auf unsere Darstellung eingewirkt. Die erste und wichtigste Frage ging nämlich dahin, ob das Protagon die lysinogene Substanz darstellt oder nicht, dann in zweiter Reihe — vorausgesetzt, daß dies der Fall wäre — ob die aktive Substanz eine Komponente des Protagons ist. War aber das Protagon in bezug auf Hämolysinbildung unwirksam, so war die ganze Protagonfrage für unser Thema gleichgültig.

Um die Phosphatide aus der eingetrockneten Benzollösung zu extrahieren, haben wir Alkohol benutzt. Teils haben wir mit kaltem Alkohol extrahiert, wodurch das Lecithin und andere damit verwandte Phosphatide (Kephalin) gelöst werden, während das

Protagon zurückbleibt; teils stellten wir das Protagon nach dem gewöhnlichen Verfahren durch Extraktion mit 85 proz. Alkohol bei 45° dar. Zuletzt haben wir nach Thudichum kochenden Alkohol angewendet, und zwar weil man ihm zufolge bei 45° die Phosphatide nur zum Teil extrahieren kann, was auch unsere Ergebnisse bestätigten. Nebenbei haben wir Alkohol von verschiedener Konzentration benutzt.

Unsere Versuche der Alkoholextraktion umfassen hiernach drei Serien: 1. Untersuchung der Substanzen, die durch kalten Alkohol extrahiert werden können, 2. Untersuchung der Fraktion, welche durch 85 proz. Alkohol bei 45° in Lösung geht, und 3. Untersuchung der Körper, die sich durch kochenden Alkohol verschiedener Konzentration ausziehen lassen.

1. Versuche mit kaltem Alkohol von 92 Proz. Schon bei Vorversuchen mit dem Alkoholextrakte des nicht mit Benzol behandelten ersten Acetonrückstandes beobachteten wir, daß das Extrakt, trotzdem es einen reichlichen Niederschlag mit Cadmiumchlorid gab und folglich Phosphatide enthielt, nicht die geringste Hämolysinbildung bewirkte. Durch Versuche mit acetonextrahiertem Benzolauszug haben wir dies endgültig feststellen können.

Das Lecithin, welches hier vorkommt, hat somit nichts mit der lysinogenen Substanz zu tun.

Die lysinogene Substanz ist ganz alkoholunlöslich und ist demgemäß in der alkoholunlöslichen Fraktion zu finden, wie man aus folgenden Versuchen ersehen kann.

Die zur Trockne gebrachte Benzollösung von 150 ccm Ätherextrakt, welche danach mit Aceton extrahiert war, wurde mit kaltem Alkohol fraktioniert. Die eingetrocknete Alkohollösung sowie der „Alkoholrückstand" wurden den Versuchstieren (Nr. 67 und 68) eingespritzt. Nach einer Injektion starke, nach zwei Injektionen sehr starke hämolytische Wirkung des Serums jenes Tieres, das den Alkoholrückstand erhalten hatte, während das andere Tier nach zwei Injektionen keine Hämolysinbildung aufwies. Die Versuche wurden mit demselben Ergebnisse wiederholt.

Merkwürdigerweise zeigte sich aber, daß bei Koagulation der Erythrocyten mit kaltem Alkohol die lysinogene Substanz teilweise in die Alkohollösung übergeht, die daher nach Eintrocknen und Einspritzen eine allerdings nur schwache Hämolysinbildung hervorruft. Dies Verhalten findet bei den Ätherversuchen seine Analogie.

2. Die Protagonversuche. In einem Versuche, in welchem das „Protagon" aus 250 ccm Blut quantitativ extrahiert und dem Versuchstiere eingespritzt wurde, fand sich keine Hämolysinbildung. In einem anderen Versuche, wo wir allerdings kochenden Alhohol benutzten, wurde sowohl das Protagon als auch der alkoholunlös-

liche Teil dargestellt und eingespritzt. Das Protagon erwies sich als inaktiv, die unlösliche Fraktion bewirkte dagegen Hämolysinbildung (totale Hämolyse).

Die lysinogene Substanz ist somit kein „Protagon“; die aktive Substanz ist in 85proz. Alkohol bei 45° unlöslich.

3. Versuche mit kochendem Alkohol. In Übereinstimmung mit Thudichum haben wir auch in bezug auf das Blut konstatieren können, daß man bei Anwendung von kochendem Alkohol eine größere Ausbeute an Lipoidstoffen, insbesondere Phosphatiden, erhält als bei Anwendung niedriger Temperatur. Wir haben weiter, wie früher Thudichum, beobachtet, daß beim Kochen mit Alkohol eine teilweise Anhydrierung eintritt und daß nachfolgende Einwirkung von kochendem Wasser die Phosphatide wieder hydrierte und alkohollöslich machte. Wir kochten deswegen den Rückstand der Benzollösung nach der zweiten Acetonbehandlung mit etwa 30 bis 40 ccm Alkohol aus, behandelten den Rückstand (wenn nicht absoluter Alhohol benutzt worden war) mit ein wenig kochendem Wasser, fügten hiernach die berechnete Alkoholmenge zu, kochten aufs neue usw., bis etwa 150 ccm Alkohol zur Verwendung gekommen waren. Von unseren recht zahlreichen Versuchen hierüber führen wir die Versuche Nr. 108 und 109 an, wo wir mit kochendem, 92 proz. Alkohol extrahiert hatten. Nach zwei Injektionen der alkoholunlöslichen Fraktion trat sehr starke Hämolysinbildung ein, während der alkohollösliche Teil ganz unwirksam war. Ebenso in zwei anderen Versuchen.

Sonach ist die aktive Substanz auch in kochendem, 92proz. Alkohol unlöslich. Sie kann daher kaum mit einem der Phosphatide Thudichums aus Gehirn identisch sein, da diese sämtlich in kochendem Alkohol löslich sind.

Die Wichtigkeit dieser Tatsache veranlaßte uns, auch die Phosphatide aus dem Blute nach Thudichums Chlorcadmiummethode darzustellen, um sie in größerer Menge injizieren zu können. Es gelang uns, die Chlorcadmiumverbindungen und hieraus die Phosphatide: Kephalin, Sphingomyelin und Amidomyelin darzustellen. Nur das Amidomyelin ist bereits von Thudichum aus dem Blute dargestellt. Das Kephalin ist nicht mit dem Gehirnkephalin identisch. Alle diese wurden in großen Dosen durch längere Zeit (4 bis 5 Injektionen) eingespritzt, ohne irgend welche Wirkung hervorzubringen.

Die lysinogene Substanz kann folglich unmöglich einem früher bekannten Phosphatid entsprechen. Es

war indessen denkbar, daß hier alkoholunlösliche Phosphatide vorlagen. Nach der Veröffentlichung unserer vorläufigen Mitteilung hat uns Herr Prof. Bock in Kopenhagen, welcher seit langem mit den Phosphatiden beschäftigt ist, darauf aufmerksam gemacht, daß ihm Phosphatide begegnet sind, die nicht in heißem Alkohol, wohl aber in heißem Essigäther löslich waren und sich aus letzterem beim Abkühlen ausschieden. Obwohl wir die Löslichkeit der lysinogenen Substanz im Essigäther nach ihrem sonstigen Verhalten bezweifelten, haben wir uns doch durch eigene Versuche von ihrer Unlöslichkeit überzeugt.

In diesem Zusammenhang dürfen wir auf einen Versuchsfehler hinweisen, welcher uns bei den Essigätherversuchen einmal veranlaßte, anzunehmen, daß die Substanz in Essigäther löslich ist. Der Irrtum war veranlaßt durch die äußerst feine Verteilung der unlöslichen Substanz, wodurch deren Abscheidung erschwert wird. Bei der Filtration geht sie durch das Filter und nur durch intensive Zentrifugierung gelingt ihre Abscheidung.

Endlich haben wir die Einwirkung von Alkohol verschiedener Konzentrationen und zwar von 80proz. und absolutem Alkohol untersucht.

Bei den Versuchen Nr. 110 und 111 stellte sich heraus, daß die lysinogene Substanz in kochendem, absolutem Alkohol völlig unlöslich war. Die unlösliche Fraktion (Nr. 110) bewirkte im Kaninchenserum starke Hämolysinbildung (nach zwei Injektionen totale Hämolyse); die lösliche Fraktion war nach zwei Injektionen ganz unwirksam.

Dasselbe haben wir auch bei der Anwendung von 80proz. Alkohol beobachtet (nach drei Injektionen totale Hämolyse bzw. keine Hämolysinbildung). Alle Alkoholextraktionen wurden mit dem trockenen Rückstand der acetonbehandelten Benzollösung ausgeführt. Die lysinogene Substanz ist sonach in absolutem und 80proz. Alkohol ebensowenig löslich als in 92proz. Alkohol.

Ebenso wie der Alkohol ein Extraktionsmittel der Phosphatide ist, ist er es auch für die Cerebroside. Es gilt daher, was wir betreffs der Phosphatide ausgesprochen haben, auch für die zweite Gruppe. Die aktive Substanz kann unmöglich mit einer Substanz dieser Gruppe identisch sein. Da aber von Thudichum auch in heißem Alkohol schwerlösliche Cerebroside beschrieben sind, so ist nicht undenkbar, daß es auch ganz alkoholunlösliche gibt.

g) Zusammenfassung der Versuchsergebnisse, die immunisierende Substanz betreffend.

Die hauptsächlichsten Ergebnisse unserer Untersuchungen über die lysinogene (immunisierende) Substanz lassen sich in folgender Weise zusammenfassen.

Durch Extraktion der Blutkörperchen oder der Stromata mit Äther läßt sich eine Substanz ausziehen, die bei Injektion in den Versuchstieren Hämolysinbildung bewirkt. Der „Immunkörper“, den man hierdurch erhält, ist mit dem identisch, den man durch Injektion von Blutkörperchen erhält. Die lysinogene Substanz verträgt in Kochsalzlösung suspendiert Siedetemperatur durch 1 bis 2 Minuten (vielleicht auch länger, was wir jedoch nicht untersucht haben), ist also kochbeständig. Sie verträgt auch kurzes ($^1/_2$ Minute dauerndes) Kochen in einem alkalischen und salzsauren Medium. Sie ist in Äther, Aceton, kaltem und heißem Alkohol verschiedener Konzentrationen und in Essigäther unlöslich, während sie von kochendem Benzol gelöst wird und darin auch nach dem Abkühlen gelöst bleibt. Daß sie trotz der Unlöslichkeit in reinem Äther in das erste Ätherextrakt übergeht, läßt sich aus der Gegenwart acetonlöslicher Körper erklären, welche ihre Ätherlöslichkeit vermitteln. Auf Grund ihrer chemischen Reaktionen läßt sich mit Sicherheit sagen, daß sie nicht Fett oder Cholesterin oder ein Eiweißkörper ist, ebensowenig ist sie nach ihren chemischen Eigenschaften unter die bis jetzt bekannten Phosphatide oder Cerebroside einzureihen*).

Begreiflicherweise wäre es sehr wünschenswert gewesen, neben diesen negativen Befunden auch positive Angaben über die Zusammensetzung der reinen Substanz machen zu können. Das ist uns aber noch nicht möglich gewesen. Einerseits ist es kaum wahrscheinlich, daß der Rückstand, welchen wir nach der letzten Aceton- und der nachfolgenden Alkoholbehandlung der eingetrockneten Benzollösung erhielten, die reine Substanz darstellt, andererseits hätte es — selbst wenn dies der Fall wäre — zu große Arbeit erfordert, analysenreines Material in genügender Menge zu erhalten, da die Ausbeute an den dargestellten Endprodukten stets verschwindend klein war. Diese Erwägungen haben uns veranlaßt, von weiteren Versuchen zur Erforschung der chemischen Natur unserer Substanz Abstand zu nehmen.

Endlich möchten wir auch erwähnen, daß durch Injektionen der genannten Ätherextrakte keine Agglutinine gebildet werden.

---

*) Bei weiteren Untersuchungen, während der Drucklegung, haben wir gefunden, daß die lysinogene Substanz in destilliertem Wasser unlöslich ist.

3. Nachweis und Charakteristik der neutralisierenden Substanz.

a) Die Neutralisationswirkung des Ätherextraktes.

Während des größten Teiles der Zeit, die die vorliegende Arbeit in Anspruch nahm, sind wir, ebenso wie die meisten modernen Forscher auf dem Gebiete der Immunität, unter dem Einflusse der so überaus anregenden Ehrlichschen Seitenkettentheorie gestanden und haben gesucht, unsere Beobachtungen mit dieser Theorie in Übereinstimmung zu bringen.

Die von uns untersuchte lysinogene Substanz entspricht selbstverständlich dem Ehrlichschen Blutkörperchenreceptor. Ehrlich behauptet ja, daß dieser die Amboceptorbildung hervorruft, eine Funktion, die auch unserem Ätherextrakt zukommt. Diesen Effekt bewirken die Receptoren der Theorie nach dadurch, daß sie mit Hilfe ihrer chemischen Affinität sich mit gewissen im Versuchstier vorhandenen Receptoren dritter Ordnung verbinden, diese dadurch neutralisieren und so eine Neubildung und ein Abstoßen der Amboceptoren bewirken. Diese Affinität zwischen den Blutkörperchenreceptoren und Amboceptoren, welche die Hauptbedingung der Amboceptorbildung ist, läßt sich auch nach Ehrlich und Morgenroth beim Versuche in vitro demonstrieren. Der bekannte Versuch über die Bindung zwischen den Amboceptoren und Blutkörperchen im Reagenzglase ist nämlich diesen Autoren zufolge eine Reproduktion in vitro der vitalen Verhältnisse bei der Amboceptorbildung. Die Bindung wird in beiden Fällen als dieselbe angesehen. Durch sie wird die Receptorseite der Amboceptoren gesättigt, neutralisiert, und, wenn einmal neutralisiert sind, die Amboceptoren, wie sich leicht zeigen läßt, den übrigen Blutkörperchen gegenüber unwirksam.

Da nun weiter unsere lysinogene Substanz bei den Injektionsversuchen dem Ehrlichschen Receptor entspricht, und da der Theorie nach die Bindung des Receptors, welche im Tierorganismus erfolgt und eine notwendige Voraussetzung der Amboceptorproduktion bildet, dieselbe ist, wie die, die man zwischen Receptor und Amboceptor in vitro auftreten sieht, so war anzunehmen, daß auch unsere Extrakte, falls man genügende Quantitäten davon dem Amboceptor zufügte, die Hämolyse bei nachträglichem Zusatz von Komplement und Blutkörperchen zu verhindern vermöchten. Die lysinogene Substanz sollte sich eben mit dem Amboceptor verbinden, denselben neutralisieren und ihn so den Blutkörperchen gegenüber unwirksam machen.

Von solchen Voraussetzungen ausgehend haben wir verschiedene einschlägige Versuche angestellt und führen hier von diesen einige an.

Das Ätherextrakt der Blutkörperchen von 37 ccm Blut wurde im Vakuum eingetrocknet, der so erhaltene Rückstand in 37 ccm 0,8proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt (= N*). Ein Teil davon wurde 10 Minuten lang gekocht (= N 100°) und von diesem ein kleines Quantum filtriert (= N 100° filtr.). Das Filtrat war ein wenig opaleszent.

1 ccm N	+ 0,05 ccm Ser. nach ½ Stde.	+ 0,5 ccm NS + Ochsenblut	0
1 „ N 100°	+ 0,05 „ „ „ „		0
1 „ N 100° filtr.	+ 0,05 „ „ „ „		0
	0,05 „ „ „ „		++++

Schon aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Ätherextrakt, wie erwartet, das Hämolysin neutralisierte, das heißt die Hämolyse verhinderte. Es scheint weiter, daß die neutralisierende Substanz des Extraktes ebenso wie die lysinogene Substanz kurzes Kochen verträgt. Endlich zeigt der Versuch, daß das aufgeschwemmte Extrakt auch nach Filtration die neutralisierende Wirkung behält. Das letztere Verhalten war für uns um so wichtiger, als man sonst hätte meinen können, das in der 0,8proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmte, ganz undurchsichtige Extrakt könnte vielleicht die Neutralisation durch mechanisches Mitreißen des Hämolysins bewirkt haben. Dies war also nicht der Fall, und da wir in anderen Versuchen ganz wasserklare, nicht opaleszierende Filtrate von neutralisierender Wirkung dargestellt haben, dürfen wir zweifelsohne annehmen, daß es sich bei der Neutralisation um einen chemischen Prozeß handelt.

Von Versuchen, wie den oben angeführten, haben wir unzählige ausgeführt, doch nicht immer mit gleich gutem Ergebnisse, was sicher von der ungleichen neutralisierenden Wirkung der verschiedenen Lösungen abhängt. Mit Rücksicht auf andere dringendere Fragen haben wir es nicht für notwendig erachtet, eine vollständige Analyse aller Bedingungen, die bei der neutralisierenden Wirkung des Extraktes beteiligt sind, vorzunehmen. Doch waren wir gezwungen, uns über den Einfluß folgender drei Faktoren: des Kochens, des Alters und der Filtration, zu orientieren. Wenn wir nämlich ein sehr wirksames Extrakt dargestellt hatten, war es selbstverständlich vorteilhaft, es längere Zeit in sterilem Zustande und womöglich in klarer Lösung zu Neutralisationsversuchen benutzen zu können.

*) N bedeutet hier und in den folgenden Versuchen die Flüssigkeit, welche die neutralisierende Substanz enthält. Ser. bedeutet amboceptorhaltiges, bei 55° inaktiviertes Serum und NS ist Normalserum. Was die übrigen Bezeichnungen betrifft, verweisen wir auf die Anmerkung zu der Versuchsserie Nr. 1, S. 246.

Versuchsserie Nr. 2.

Von einer neutralisierenden Aufschwemmung (N), die während 8 Tagen im Eisschranke aufbewahrt worden war, wurden einige Cubikcentimeter filtriert (= N filtr.), ein wenig hiervon wurde aufgekocht (N filtr. 100°), ein zweiter Teil wurde 5 Sek. gekocht (= N 100° 5 sec) und von diesem wurden nach dem Erkalten wenige Cubikcentimeter filtriert (= N 100° 5 sec filtr.). Ein dritter Teil von N wurde zuvor 5 Sek. und später nach dem Erkalten noch 4 Min. gekocht (= 100° 5 sec 4 min), überdies kam das Filtrat dieser letzten Aufschwemmung (= N 100° 5 sec 4 min filtr.) zur Verwendung. Alle filtrierten Flüssigkeiten waren wasserhell.

1. 0,5 ccm 0,8 proz. NaCl-Lösung	+ 0,05 ccm Ser.	nach ½ Std. mit 0,4 ccm NS + Ochsenblut versetzt	++++
2. 0,5 „ N	+ 0,05 „ „		++
3. 0,5 „ N filtr.	+ 0,05 „ „		+++
4. 0,5 „ N filtr. 100°	+ 0,05 „ „		+++
5. 0,5 „ N 100° 5 sec	+ 0,05 „ „		+
6. 0,5 „ N 100° 5 „ filtr.	+ 0,05 „ „		++
7. 0,5 „ N 100° 5 „ 4 min	+ 0,05 „ „		+++
8. 0,5 „ N 100° 5 „ 4 „ filtr.	+ 0,05 „ „		++++

Endlich Versuche 8 Tage früher und 8 Tage später unter Verwendung derselben N-Aufschwemmung und desselben Ser. und ebenso wie jetzt mit ganz frischem NS.

18. Okt. 0,5 ccm 0,8 proz. NaCl-Lösung	+ 0,05 ccm Ser.	nach ½ Stunde	++++
0,5 „ N	+ 0,05 „ „		0
3. Nov. 0,5 „ 0,8 proz. NaCl-Lösung	+ 0,05 „ „		++++
0,5 „ N	+ 0,05 „ „	+ 0,4 ccm NS + Ochsenblut	++++
1 „ N	+ 0,05 „ „		+++
5 „ N	+ 0,05 „ „		0

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß kurzes Kochen (von 5 Sek. Dauer) die neutralisierende Wirkung eines Extraktes erhöht, wahrscheinlich durch eine bessere Extraktion der neutralisierenden Substanz aus den aufgeschwemmten Massen. Dagegen bewirkt Kochen durch etwas längere Zeit (4 Min.) Abschwächung. Bei Filtration ist das Filtrat nicht von derselben Wirkung wie die ursprüngliche Aufschwemmung, wahrscheinlich weil nicht die ganze neutralisierende Substanz in Lösung geht. Vielleicht hält auch der Rückstand etwas von der neutralisierenden Substanz zurück. Weiter nimmt die Neutralisationswirkung beim Stehen ziemlich rasch ab, auch wenn sie steril im Eisschrank aufbewahrt wird, wie z. B. daraus hervorgeht, daß die betreffende Aufschwemmung in 14 Tagen (18. Oktober bis 3. November) sehr viel von ihrer Wirkung verlor.

Eine ähnliche Abschwächung, wie sie hier für die Lösung der neutralisierenden Substanz in 0,8proz. Kochsalzlösung gefunden ist, beobachtet man auch in betreff der Neutralisationswirkung der ursprünglichen Ätherlösung.

b) Spezifizität der Neutralisation.

Es fragt sich dann, inwieweit diese neutralisierende Wirkung unserer Extrakte eine spezifische ist. Diese Frage haben wir dadurch zu beantworten versucht, daß wir zu gleicher Zeit die Einwirkung der neutralisierenden Substanz untersuchten und zwar einerseits auf die Hämolyse von Meerschweinchenblut durch Serum 56, welches von einem mit solchem Blute immunisierten Kaninchen herstammte, andererseits auf die Hämolyse von Ochsenblut durch Kaninchenserum 34 von einem Tiere, welches Einspritzungen von Ochsenblut erhalten hatte.

20 ccm Ätherextrakt, entsprechend 20 ccm Blut, wurde eingetrocknet und der Rückstand in 10 ccm 0,8proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt = N.

1 ccm N + 0,3 ccm Ser. 34	nach $^1/_2$ Stunde + 0,3 ccm NS + 2 ccm 5proz. Ochsenblut	0
1 ccm N + 0,1 ccm Ser. 56	nach $^1/_2$ Stunde + 0,3 ccm NS + 2 ccm 5proz. Meerschweinchenblut	++++
0,3 ccm Ser. 34 + 0,3 ccm NS + 2 ccm 5proz. Ochsenblut		++++
0,1 ccm Ser. 56 + 0,3 ccm NS + 2 ccm 5proz. Meerschweinchenblut		++++
0,3 ccm Ser. 34 + Ochsenblut		0
0,1 ccm Ser. 56 + Meerschweinchenblut		0

Aus den Versuchen geht deutlich hervor, daß die Neutralisation, welche wir beobachtet haben, von spezifischer Natur ist und daß sie nichts mit der nichtspezifischen Neutralisation, wie sie z. B. durch große Mengen Cholesterin erhalten wird, zu tun hat. (Die Cholesterinneutralisation ist bereits von Kyes und Sachs, Landsteiner und v. Eisler, sowie Pascucci beobachtet worden.) Damit wollen wir jedoch nicht sagen, daß die Spezifizität eine absolute ist; das ist sie nicht, ebenso wie die Spezifizität der Hämolysine nicht absolut, sondern nur relativ ist.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen ist im Juni 1904 die Arbeit von Landsteiner und v. Eisler[8]): „Über die Wirkungsweise der hämolytischen Sera", und im Juli 1905[9]) eine weitere Arbeit von denselben Verfassern: „Über Agglutinin- und Lysinwirkung" erschienen, welche letztere in betreff der Hämolysine eine Fortsetzung der ersteren darstellt.

Während unsere Arbeit zur Aufgabe hatte, den amboceptorbildenden Faktor zu studieren und wir bei dieser Arbeit unter dem Einflusse der Ehrlichschen Theorie zu den Neutralisationsversuchen gekommen waren, haben Landsteiner und v. Eisler ähnliche Versuche auf Grund anderer Überlegungen angestellt. Sie gingen von den früheren Versuchen von Landsteiner und Jagić über Hämolyse durch Kieselsäure-Lecithin und von der Arbeit von Kyes

und Sachs über Hämolyse durch Kobragift-Lecithin aus. Diese beiden Formen der Hämolyse beruhen nach ihrer Annahme darauf, daß das Lecithin im ersten Falle durch die Kieselsäure, im zweiten durch Kobragift „an die Blutkörperchen gebunden wird, und daß das so gespeicherte Lecithin die Blutzellen vermöge seiner fettähnlichen Beschaffenheit ebenso auflöst, wie nach bekannten Erfahrungen eine ganze Reihe fettlösender Stoffe, z. B. Äther und Öl; daß also das Lecithin mit den Lipoidstoffen reagiere, um Hämolyse zu erzeugen“. Die Vermutung, daß auch die von den aktiven Sera hervorgerufene Hämolyse durch die Einwirkung des Hämolysins auf die Lipoidstoffe zustande komme, gab den Anstoß zu ihren Versuchen.

Diese Versuche, welche teils mit Petroläther, teils mit Ätherextrakten verschiedener Blutkörperchen ausgeführt wurden (betreffs der Technik und Versuchsanordnung sei auf das Original verwiesen), ergaben, daß diesen Extrakten eine neutralisierende Wirkung gegenüber dem Hämolysin zukommt, welche zwar keine absolut, aber doch eine so hervortretend relativ spezifische ist, daß sie anscheinend der in der Tat auch sehr relativen Spezifizität der hämolytischen Sera vergleichbar ist.

Das Erscheinen dieser Arbeit war uns sehr willkommen, denn einerseits stimmten die Ergebnisse mit der aus unseren Versuchen sich ergebenden Auffassung der Neutralisationswirkung der Extrakte als einer spezifischen Wirkung überein, andererseits machten die mit so großer Sorgfalt ausgeführten Untersuchungen weitere Versuche von uns über diese Spezialfrage überflüssig.

c) Die Verschiedenheit der neutralisierenden und immunisierenden Substanzen.

Nachdem die Spezifizität der Neutralisationswirkung der Ätherextrakte festgestellt war, untersuchten wir in dem Maße, als die Untersuchung der lysinogenen Substanz fortschritt, jedesmal die Neutralisationswirkung jener Fraktionen, welche die Eigenschaft besaßen, Hämolysinbildung hervorzurufen, denn von diesen war der Ehrlichschen Theorie nach eine solche neutralisierende Wirkung zu erwarten.

Wir beobachteten hierbei, daß die Aufschwemmungen des Acetonrückstandes nach der ersten Acetonextraktion lysinogene und neutralisierende Wirkung aufwiesen; dasselbe war mit eingetrockneter Benzollösung der Fall. Nach Acetonextraktion der letztgenannten Lösung sahen wir aber zu unserer großen Überraschung, daß der

acetonunlösliche Teil, obgleich er keine Neutralisationswirkung besaß, Hämolysinbildung veranlaßte, während dagegen die acetonlösliche Fraktion, deren Injektion keine Hämolysinbildung auslöste, das Hämolysin zu neutralisieren vermochte.

Wir waren somit zu einem Punkte gekommen, wo immunisierende und neutralisierende Substanz sich verschieden verhielten.

Indem wir bemerken, daß wir mehrere übereinstimmende Versuche hierüber besitzen, wollen wir dieses Verhalten hier nur durch ein paar Versuchsserien belegen.

Versuchsserie Nr. 3.

8. Dezember. 10 ccm einer sehr aktiven Benzollösung, nach der früher beschriebenen Methode dargestellt, wurden zur Trockne gebracht; der Rückstand wird sehr genau mit Aceton behandelt, die Acetonlösung neuerlich eingeengt und der Rückstand in 10 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt = AcL.

Der nicht in Aceton lösliche Teil wurde, nachdem er ganz von Aceton befreit worden war, auch in 10 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt = AcR.

0,05 ccm Ser.	nach ½ Std. mit 0,3 ccm NS und Ochsenblut versetzt	+++
1 ccm AcL + 0,05 „ „		0
1 „ AcR + 0,05 „ „		+++

Die übrigen 9 ccm AcL wurden dem Kaninchen 66 injiziert.
„ „ 9 „ AcR „ „ „ 65 „

15. Dezember. Es wurden jedem der Kaninchen einige Cubikcentimeter Blut entnommen; die Sera hiervon Ser. 65 und Ser. 66.

0,4 ccm Ser. 65 + 0,4 ccm NS + Ochsenblut . . . . . . ++
0,4 „ „ 66 + 0,4 „ „ + „ 0

Jetzt wurde ganz dieselbe Prozedur wie am 8. Dezember wiederholt und am 22. Dezember wurden noch einmal Blutproben genommen; die Sera hiervon gaben bei Untersuchung auf ihre hämolytische Wirkung folgende Resultate:

0,4 ccm Ser. 65 + 0,4 ccm NS + Ochsenblut . . . . ++++
0,4 „ „ 66 + 0,4 „ „ + „ 0

Diese Beobachtungen scheinen uns eine hervorragende Bedeutung zu besitzen.

Wir hatten schon früher gesehen, daß auch das erste Acetonextrakt eine Neutralisationswirkung ohne hämolysinbildende Wirkung aufwies, legten aber dieser Tatsache in Anbetracht des großen Cholesteringehaltes der Lösung und der bekannten neutralisierenden Wirkung des Cholesterins keine größere Bedeutung bei, zumal da auch der lysinogene acetonunlösliche Teil eine Neutralisationswirkung aufwies.

Wenn es uns aber nun gelungen war, die beiden Wirkungen zu trennen, sahen wir darin eine Erschütterung der Ehrlichschen Hämolysinlehre, da wir damals die neutralisierende Substanz als mit dem Bestandteil der Erythrocyten, auf welchem der Amboceptor verankert wird, identisch auffaßten und somit annahmen, daß unsere neutralisierende Substanz, um das Ehrlichsche Schema zu benutzen, die Receptorseite des Amboceptors neutralisierte.

Zu dieser Auffassung waren wir aber gekommen einerseits auf Grund der oben erwähnten relativen Spezifizität der neutralisierenden Substanz — denn nach der Hämolysinlehre ist die Spezifizität an den Amboceptor gebunden — andererseits auf Grund der Erfahrung, daß die neutralisierende und lysinogene Wirkung durch mehrere Glieder der Behandlung hindurch stets nebeneinander nachweisbar waren, was der Ehrlichschen Theorie entsprach. Als wir anfangs Oktober 1905 unsere vorläufige Mitteilung [11]) niederschrieben, hegten wir noch dieselbe Auffassung. Auch aus den Untersuchungen von Landsteiner und v. Eisler sehen wir, daß diese Autoren auf gleichem Standpunkte stehen. (Über Agglutinin- und Lysinwirkung, S. 314.)

d) Die neutralisierende Substanz wirkt auf das Komplement.

Wir sind nun gezwungen, diesen Standpunkt zu verlassen, da uns eine Reihe von Versuchen Ergebnisse geliefert hat, die ganz bestimmt gegen eine solche Auffassung sprechen.

Was uns zuerst betreffs der Wirkung der neutralisierenden Substanz auf den Amboceptor zu Zweifel Anlaß gab, waren Versuche, in welchen bei den verschiedenen Proben die Menge des zugesetzten Komplements wechselte, während der Gehalt an Immunkörper und neutralisierender Substanz derselbe war. Das Verhältnis zwischen Amboceptor und Komplement war in den Proben, welche die geringste Komplementquantität enthielten, derartig austitriert, daß ein vermehrter Komplementzusatz keine größere Hämolyse zu bewirken vermochte. Wir beobachteten aber unter diesen Bedingungen, daß, während die Neutralisation des Hämolysins in Proben mit wenig Komplementzusatz eine totale war, Proben mit mehr Komplement eine sehr starke bis totale Hämolyse zeigten. Solche Beobachtungen ließen sich nicht mit der Vorstellung einer Neutralisation des Amboceptors in Übereinstimmung bringen. Zur weiteren Aufklärung wurden folgende Versuche angestellt.

Versuchsserie Nr. 4.

1. 0,05 ccm Ser. + Ochsenblut 0
2. 0,05 „ „ + 0,5 ccm NS + Ochsenblut . . . . ++++
3. 0,5 „ N + 0,05 ccm Ser. nach $^1/_2$ Stunde + 0,5 ccm NS + Ochsenblut 0
4. 0,5 ccm N + 0,05 ccm Ser. nach $^1/_2$ Stunde + 1 ccm NS + Ochsenblut . . . . +++
5. 0,5 ccm N + 0,05 ccm Ser. nach $^1/_2$ Stunde filtriert + 0,6 ccm NS + Ochsenblut . . . . +++
6. 0,5 ccm N + 0,05 ccm Ser. nach $^1/_2$ Stunde filtriert + 0,05 ccm Ser. + 0,3 ccm NS + Ochsenblut 0
7. 0,5 ccm N + 0,5 ccm NS nach $^1/_2$ Stunde filtriert + 0,05 ccm Ser. + Ochsenblut 0
8. 0,5 ccm N + 0,5 ccm NS nach $^1/_2$ Stunde filtriert + 0,05 ccm Ser. + 0,6 ccm NS + Ochsenblut . . . . ++++

Aus Versuch 3 ist ersichtlich, daß die zugesetzte Quantität der neutralisierenden Substanz zur Neutralisation der hier benutzten Mischung von Amboceptor und Komplement genügt. Wird nun die Komplementquantität vermehrt, während die Amboceptormenge unverändert bleibt, tritt ungeachtet desselben N-Zusatzes Hämolyse ein. Hieraus geht hervor, daß der Amboceptor nicht neutralisiert ist. Die Möglichkeit aber, daß sich dessenungeachtet die neutralisierende Substanz (N) mit dem Amboceptor verbindet, und in Versuch 4 aus dieser Bindung nur durch Massenwirkung des Komplements ausgetrieben worden ist, wird durch Versuch 6 ausgeschlossen, wo ein vielfacher Amboceptorzusatz keine Hämolyse bewirkt.

Beim Vergleich der Versuche 5 und 6, in welchen die Mischung der neutralisierenden Substanz und des Amboceptors vor dem Zusatze von Komplement und Blut filtriert worden war, sehen wir ebenfalls, daß der Amboceptor nicht neutralisiert worden ist, denn in Versuch 5 erhalten wir durch den Zusatz von nur 0,05 ccm amboceptorhaltigen Serums eine sehr starke Hämolyse, während in Versuch 6 mit der doppelten Amboceptorquantität, aber mit der halben Komplementmenge, keine Hämolyse eintritt. Dasselbe geht auch aus den Versuchen 7 und 8 hervor, wo N dem NS zugesetzt und die Mischung vor dem Zusatze der anderen Faktoren filtriert worden war.

Sämtliche diese Versuche weisen bestimmt darauf hin, daß die neutralisierende Substanz auf das Komplement und nicht auf den Amboceptor einwirkt. Dies wird durch folgendes Experiment weiter erhärtet:

N ergab nach Filtration ein wasserklares Filtrat = N filtr. 1 ccm N filtr. + 0,05 ccm Ser. wurden gemischt und nach einer halben Stunde mit Blutkörperchen von 2 ccm 5 proz. Ochsenblut versetzt. Nach einer weiteren halben Stunde wurde die Mischung zentrifugiert und die klare Lösung abpipettiert. Die Erythrocyten wurden zweimal mit 0,8 proz. Kochsalzlösung gewaschen, dann in 1 ccm Kochsalzlösung suspendiert und mit 0,3 ccm NS versetzt = ++++.

Zu der klaren abpipettierten Lösung setzte man 0,05 ccm Ser. + 0,3 ccm NS + Ochsenblut = 0.

In einem anderen Versuche mit verschiedenem Serum und ebenfalls filtrierter, wasserklarer N-Lösung:

0,02 ccm Ser. + 0,4 ccm NS + Ochsenblut . . . . ++++
0,02 ccm Ser. + 1 ccm N filtr. + 0,4 ccm NS + Ochsenblut . . . 0

Die letztere Probe wurde nun zentrifugiert, das Blutkörperchensediment zweimal mit 0,8proz. NaCl-Lösung gewaschen und nachher mit 1 ccm Kochsalzlösung und 0,4 ccm NS versetzt. Totale Hämolyse.

Durch diese und viele ähnliche Versuche sehen wir es als bewiesen an, daß die neutralisierende Substanz nicht auf den Amboceptor einwirkt, sondern daß sie sich direkt auf dem Komplement fixiert und nur mit diesem reagiert.

e) Die Löslichkeitsverhältnisse der neutralisierenden Substanz.

In Vervollständigung der Angaben über die Eigenschaften der neutralisierenden Substanz geben wir nachstehend eine Übersicht über deren Löslichkeitsverhältnisse.

Sie ist in den gewöhnlichen fettlösenden Reagenzien, wie Äther, Benzol, Aceton, Alkohol und Chloroform löslich. Von Landsteiner und v. Eisler ist sie mit Petroläther extrahiert worden. Daneben ist sie aber auch in 0,8proz. Kochsalzlösung löslich, wovon wir öfters Nutzen gezogen haben. Dagegen kann man mit destilliertem Wasser keine klare, sondern nur eine opalescierende Lösung erhalten. Versetzt man diese mit Kochsalz, so klärt sie sich unter Bildung eines Bodensatzes. Um wasserklare neutralisierende Kochsalzlösungen zu erhalten, kann man aber nicht ohne weiteres das ursprüngliche Ätherextrakt der Blutkörperchen benutzen, da man in diesem Falle eine phosphatidhaltige und demgemäß stark opalescierende Lösung bekommt. Man muß daher vor der Extraktion mit Kochsalzlösung die Phosphatide auf irgend eine Weise entfernen. Wir haben zu diesem Zwecke das ursprüngliche Ätherextrakt mit Aceton ausgezogen und aus dem Trockenrückstand der Acetonlösung durch Extraktion mit kochender Kochsalzlösung und darauf folgender Filtration ganz wasserklare Lösungen erhalten.

f) Zusammenfassung der Versuchsergebnisse, die neutralisierende Substanz betreffend.

Unsere Ergebnisse, die neutralisierende Substanz betreffend, sind kurz folgende:

Die neutralisierende Substanz findet sich in den Blutkörperchen und kann aus ihnen durch Äther extrahiert werden. Sie vermag,

in passenden Proportionen zugesetzt, die Hämolyse der Blutkörperchen, aus denen sie herstammt, zu verhindern, und zwar ist diese neutralisierende Wirkung, wenngleich nicht absolut, so doch hervorragend spezifisch.

Bei dieser Neutralisation wird das Komplement und nicht der Amboceptor unwirksam gemacht (neutralisiert), und da diese Neutralisation in vollkommen klaren Lösungen stattfindet, muß man an einen chemischen Prozeß denken, bei welchem die neutralisierende Substanz und das Komplement miteinander reagieren. Da der Amboceptor hierbei nicht angegriffen wird, muß man annehmen, daß das Komplement und die neutralisierende Substanz direkt ohne Zwischenglied miteinander reagieren.

Die neutralisierende Substanz verträgt kurzes Kochen, wird aber bei längerem Kochen abgeschwächt. Dasselbe ist bei längerer Aufbewahrung der Fall.

Durch Einwirkung verdünnter Säuren oder Laugen wird sie zerstört. Nach ihrem Verhalten gegenüber chemischen Reagenzien kann man mit Sicherheit ausschließen, daß sie ein Eiweißkörper, ein Phosphatid oder Cerebrosid ist. Die Löslichkeit in Äther, Chloroform, Benzol, Aceton usw. weist auf einen fettähnlichen Körper hin, doch spricht die Löslichkeit in 0,8 proz. Kochsalzlösung gegen diese Annahme.

Mit dieser negativen Charakterisierung müssen wir uns vorläufig begnügen. Positive Angaben über die Natur der Substanz können wir vorläufig nicht beifügen, außer etwa, daß die Substanz in den Blutkörperchen sicher nur in sehr geringer Menge enthalten ist.

4. Das Verhältnis der lysinogenen und der die Hämolyse neutralisierenden Substanz zueinander und ihre Beziehung zur Amboceptorfixation. Theoretische Schlußbetrachtungen.

Es war nun zu entscheiden, ob die immunisierende und die neutralisierende Wirkung in der Tat zwei verschiedenen Substanzen angehört, oder wie es nach Ehrlichs Theorie mit der neutralisierenden Substanz und dem Receptor der Erythrocyten der Fall sein soll, nur zwei verschiedenen Eigenschaften einer und derselben Substanz entspricht. Ferner war klarzustellen, in welchem Verhältnisse die von uns extrahierten Körper zu dem erwähnten Ehrlichschen Receptor stehen.

Wir wollen daher zuerst das Verhältnis der neutralisierenden Substanz zu der immunisierenden (lysinogenen), sodann das Verhältnis der neutralisierenden und der immunisierenden Substanz zu der Amboceptorfixation erörtern.

a) Verhältnis zwischen der immunisierenden und der neutralisierenden Substanz.

Wie oben auseinandergesetzt wurde, gehen bei Extraktion der Stromata mit Äther sowohl die neutralisierende als die immunisierende Substanz in Äther über. Es scheint zunächst, als ob der Übergang beider Substanzen ganz parallel vor sich ginge. Ist nur ein kleiner Teil der neutralisierenden Substanz übergegangen, so besitzen die extrahierten Blutkörperchen noch in hohem Grade die immunisierende Wirkung. Setzt man die Ätherextraktion intensiv fort, wobei die Ausbeute an neutralisierender Substanz wächst, so nimmt die hämolysinbildende Wirkung des Rückstandes ab, und wenn man aus den Stromata keine neutralisierende Substanz mehr ausziehen kann, ist auch die hämolysinbildende Fähigkeit verloren gegangen.

Dieser Parallelismus bedeutet aber nur eine Übereinstimmung in dem Einflusse der Ätherlöslichkeit auf die Extraktion und nichts weiter. Ist das eingetrocknete Ätherextrakt einmal mit Aceton behandelt worden und sind einige Bestandteile in Aceton übergegangen, so ist zwar die neutralisierende, nicht mehr aber die immunisierende Substanz im Äther löslich. Die Übereinstimmung im Verhalten bei der ersten Ätherextraktion gilt nicht mehr für die zweite Ätherbehandlung und die Verschiedenheit tritt bei der Behandlung mit Aceton und Alkohol noch mehr hervor. Da es uns ferner, wie schon erwähnt, gelungen ist, auf der einen Seite neutralisierende und nicht immunisierende Lösungen, auf der anderen Seite immunisierende Lösungen ohne Neutralisationswirkung zu erhalten, so ist ganz unzweifelhaft, daß beide Substanzen ganz verschiedene Körper sind.

In welchem Verhältnisse sie zueinander stehen, solange sie sich nebeneinander in den Blutkörperchen vorfinden, läßt sich aus unseren Untersuchungen nicht entnehmen.

b) Die Verschiedenheit der immunisierenden von der fixierenden Substanz.

Wenn man den Erythrocyten oder Stromata durch Ätherextraktion die immunisierende (lysinogene) Substanz entzieht, verlieren sie zugleich die Fähigkeit, die zugehörigen Amboceptoren zu fixieren. Dieses Verschwinden des Fixationsvermögens bei Behandlung mit Äther haben auch Landsteiner und v. Eisler beobachtet. Sie heben hervor, wie diese Fähigkeit den Amboceptoren

gegenüber bei Stromata, die durch „kräftiges Schütteln der Blutzellen mit reichlichem Äther oder Petroläther dargestellt sind“, geringer ist als bei solchen, die nicht mit lipoidlösenden Reagenzien behandelt worden sind.

Die Abnahme der immunisierenden und fixierenden Eigenschaft geht ungefähr parallel und auch ihr Verschwinden aus den Stromata erfolgt etwa zur selben Zeit. In Versuchen, in denen es uns durch eine sehr intensive Ätherextraktion gelang, die immunisierende Substanz derartig vollständig zu extrahieren, daß die Injektion von solchen Stromata aus 20 ccm Blut nur die Spur einer Amboceptorbildung ergab, hat sich auch herausgestellt, daß solche Stromata nur äußerst geringe, kaum nachweisbare Spuren von Amboceptoren zu fixieren vermochten. Das gleichzeitige Verschwinden der beiden Eigenschaften bei der Ätherextraktion und die Beobachtung, daß das Ätherextrakt sowohl Immunisations- als auch Neutralisationswirkung besaß, hat uns, wie schon erwähnt, zuerst zu der Annahme geführt, daß der Träger der immunisierenden und f i x i e r e n d e n Eigenschaft einfach aus den Blutkörperchen in die Ätherlösung übergegangen war. Wir glaubten also, daß die Neutralisation die Wirkung der fixierenden Substanz sei. Wie oben gezeigt wurde, war dies ein Irrtum. Die aufgekochte Aufschwemmung des eingetrockneten Ätherextraktes reagierte nicht mit dem Amboceptor, wohl aber mit dem Komplement; sie ist daher von der fixierenden Substanz sicher verschieden.

Das Schicksal der fixierenden Substanz bei der Ätherextraktion ist uns ganz unbekannt. Es ist uns nicht gelungen, sie im Ätherextrakte nachzuweisen, und da sie sich auch nicht in dem ätherlöslichen Rückstand vorfindet, bleibt nichts übrig, als anzunehmen, daß sie bei der Ätherextraktion zerstört oder doch derartig verändert wird, daß sie nicht mehr den Amboceptor zu fixieren vermag.

Während also bei der Ätherextraktion eine Substanz und zwar die fixierende verschwindet, kommt bei derselben Gelegenheit ein neuer Faktor zutage, den wir nicht bei den unverletzten Blutkörperchen oder den mit Wasser hämolysierten Stromata beobachten können, nämlich die mit dem Komplement reagierende Substanz.

Die Mutmaßung eines genetischen Zusammenhanges zwischen diesen beiden Funktionen drängt sich unter diesen Umständen ganz natürlich auf. D a i n d e s s e n d i e e i n z i g e b e k a n n t e E i g e n s c h a f t d e r f i x i e r e n d e n S u b s t a n z e b e n i n d e m F i x a t i o n s v e r m ö g e n d e r s e l b e n b e s t e h t u n d d a d i e s e E i g e n s c h a f t s i c h n i c h t b e i d e r n e u t r a l i s i e r e n d e n S u b s t a n z v o r f i n d e t, ist ein

solcher Zusammenhang zwischen den beiden Körpern vorläufig nicht anzunehmen.

Kehren wir wieder zu der fixierenden Eigenschaft zurück, so ist ihr Verschwinden unter Erhaltenbleiben der immunisierenden Wirkung eine Tatsache von größter theoretischer Bedeutung, wenn man erwägt, daß eine der wichtigsten Grundlagen der Ehrlichschen Seitenkettentheorie eben in der Annahme besteht, daß diese beiden Wirkungen durch eine und dieselbe chemische Reaktion zwischen denselben Körpern zustande kommen und daß der einzige Unterschied nur darin besteht, daß sich diese Reaktion in dem einen Falle in vitro, in dem anderen in vivo abspielt. Auch erscheint nach dieser Theorie das Dasein eines die Amboceptorbildung hervorrufenden Körpers, welcher nicht selbst Amboceptoren zu fixieren vermag, undenkbar, und der sichere Nachweis eines solchen Körpers mit der Allgemeingültigkeit der Ehrlichschen Theorie auf dem Gebiete der Immunitätslehre unvereinbar. Ein Körper von solcher Beschaffenheit liegt nach unseren Untersuchungen hier vor. Als besonders beweisend nach dieser Richtung sind die Kaninchenversuche Nr. 65 und 66*) anzusehen, in welchen die neutralisierende Substanz aus dem Injektionsmaterial entfernt worden war. Hier erregen die zur Injektion benutzten Aufschwemmungen Amboceptorbildung, obgleich sie bei den angestellten Neutralisationsversuchen absolut keinen Einfluß auf die Hämolyse ausüben.

Zwar können auch sämtliche mit gekochtem Ätherextrakt ausgeführten Injektionsversuche, in denen eine Amboceptorbildung stattgefunden hat, als Beweis für unsere Auffassung angeführt werden, da die hierzu benutzten Aufschwemmungen zwar das Hämolysin (das Komplement) neutralisierten, aber den Amboceptor nicht fixierten. Da aber bekannt ist, wie kleine Quantitäten Blutkörperchen zur Auslösung der Hämolysinbildung genügen (Friedberger und Dorner), könnte vielleicht der Einwand erhoben werden, daß doch kleine Mengen der fixierenden Substanz in der Aufschwemmung vorhanden gewesen und nur wegen der großen Menge neutralisierender Substanz unserer Aufmerksamkeit entgangen seien.

Gegen die Kaninchenversuche Nr. 65 und 66 läßt sich dieser Einwand nicht erheben. Weiter gibt uns aber auch die Behandlung des Injektionsmaterials in diesen Versuchen einigermaßen eine Garantie dafür, daß die fixierende Substanz zerstört worden ist. Diese Substanz, die nicht einmal eine Ätherextraktion mit nach-

*) S. 263.

folgendem Kochen verträgt, müßte in diesem Fall, vorausgesetzt, daß überhaupt eine Spur davon im Ätherextrakt persistierte, nachträglich noch Acetonbehandlung, längeres Kochen mit Benzol, nochmalige Acetonbehandlung und zuletzt Kochen in 0,8proz. Kochsalzlösung vertragen haben.

Indessen haben wir in der letzten Zeit eine einfache und bequeme Methode zum Nachweis der Verschiedenheit der immunisierenden Substanz von der fixierenden gefunden. Das Verfahren besteht im Kochen des Blutes oder der Stromata. Nach unseren Beobachtungen verträgt ja die immunisierende Substanz kurzes Aufkochen. Die fixierende Substanz wird aber bei einer solchen Behandlung zerstört.

Wir verwendeten Aufschwemmungen von gewaschenen Blutkörperchen und von Stromata in 0,8proz. Kochsalzlösung *).

Die Aufschwemmung der Blutkörperchen gab beim Kochen ganz grobflockige Coagula, was sie für die Injektion wenig geeignet machte; die Aufschwemmung der Stromata dagegen gab, vorausgesetzt, daß die Stromata vor dem Kochen genau ausgewaschen worden waren, eine beinahe klare, opalescierende Lösung, in welcher nur wenige feinflockige Coagula erschienen.

Eine solche Stromalösung, welche 1 Minute gekocht worden war, hatte nur eine geringe fixierende Wirkung; nach 2 Minuten langem Kochen war überhaupt keine Einwirkung auf die Amboceptoren nachweisbar. Die Ergebnisse der mit einer solchen 2 Minuten gekochten Stromalösung angestellten Fixations- und Injektionsversuche sind am besten aus den folgenden Auszügen unserer Versuchsprotokolle ersichtlich.

Versuchsserie Nr. 5.

Stromata von 100 ccm Blutkörperchen wurden in 20 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt = Str.; die Hälfte hiervon wurde 2 Minuten gekocht = Gek. Str.

0,02 ccm Ser. + 0,4 ccm NS + Ochsenblut	+++
1 ccm Str. + 0,02 ccm Ser. wurden 1 Std. bei 37° aufbewahrt, danach zentrifugiert, die abpipettierte helle Flüssigkeit + 0,4 ccm NS + Ochsenblut	0
1 ccm Gek. Str. + 0,02 ccm Ser. wurden 1 Std. bei 37° aufbewahrt, danach zentrifugiert, die abpipettierte helle Flüssigkeit + 0,4 ccm NS + Ochsenblut	+++

Dann wurde dem Kaninchen 157 1 ccm Str. und dem Kaninchen 158 1 ccm Gek. Str. injiziert. 8 Tage nach den Injektionen wurden die Sera der Tiere auf ihre hämolytische Fähigkeit geprüft.

*) Die Stromata wurden durch Lösen von gewaschenen Blutkörperchen mit destilliertem Wasser im Verhältnis 5:50, Versetzen der Flüssigkeit nach eingetretener Hämolyse mit Kochsalz bis zu einem Gehalt von 0,8 Proz. und Zentrifugieren dargestellt, dann vier- bis fünfmal mit großen Quantitäten 0,8proz. Kochsalzlösung gewaschen.

0,5 ccm Ser. 157 + 0,5 ccm NS + Ochsenblut 0
0,5 „ „ 158 + 0,5 „ „ + „ . . . . +++

Die Versuche wurden jetzt in größerem Maßstabe wiederholt. Eine neue Stromaaufschwemmung, etwa 100 ccm Blutkörperchen entsprechend, in 15 ccm 0,8proz. NaCl wurde hierzu benutzt = Str.; Gek. Str. = der 2 Minuten gekochte Teil.

Die Fixationsversuche gaben genau dieselben Resultate wie die eben angeführten.

Dann wurden den Kaninchen 165, 166, 167 je 1 ccm Gek. Str. und den Kaninchen 168, 169, 170 je 1 ccm Str. injiziert.

8 Tage nachher wurden Blutproben entnommen und ihre Sera geprüft.

0,5 ccm Ser. 165 + 0,5 ccm NS + Ochsenblut . . . ++++
0,5 „ „ 166 + 0,5 „ „ + „ . . . +++
0,5 „ „ 167 + 0,5 „ „ + „ . . . +++
0,5 „ „ 168 + 0,5 „ „ + „ . . . ++++
0,5 „ „ 169 + 0,5 „ „ + „ . . . ++++
0,5 „ „ 170 + 0,5 „ „ + „ . . . ++++

Die Sera 165 und 168 wurden weiter geprüft:

0,1 ccm Ser. 165 + 0,5 ccm NS + Ochsenblut . . . . . ++
0,1 „ „ 168 + 0,5 „ „ + „ . . . . . ++

Zum weiteren Beweis dafür, daß nicht etwa geringe Spuren der fixierenden Substanz in den gekochten Stromalösungen vorhanden waren, haben wir die Wirkung der gekochten Stromata auf eine schwache hämolytische Flüssigkeit geprüft, die wenig Amboceptoren, aber reichlich Komplement enthielt.

Versuchsserie Nr. 6.

Stromata, entsprechend 40 ccm Blutkörperchen, wurden in 10 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt = Str. 5 ccm hiervon wurden 2 Min. gekocht = Gek. Str.

1. 0,01 ccm Ser. + 0,4 ccm NS + Ochsenblut . . . . +++

2.	0,5 „ Str.	+ 0,01 ccm Ser.	nach 1 Std. bei 37° + 0,4 ccm NS + Ochsenblut	0
3.	0,5 „ Gek. Str.	+ 0,004 „ „		+
4.	1 „ „ „	+ 0,004 „ „		+
5.	0,5 „ 0,8proz. NaCl-Lös.	+ 0,004 „ „		+

In den Proben 3 und 5 war die Hämolyse von genau derselben Stärke und nach Zufügen von 0,5 ccm 0,8proz. Kochsalzlösung stimmten sie mit Probe 4 im Grade der Hämolyse ganz überein.

Je 1 ccm dieser so geprüften Stromaaufschwemmung wurde jetzt zwei Kaninchen, 171 und 172, intraperitoneal injiziert.

Nach 8 Tagen zeigten ihre Sera folgende hämolytische Wirkung:

0,5 ccm Ser. 171 + 0,5 ccm NS + Ochsenblut . . . . +++
0,5 „ „ 172 + 0,5 „ „ + „ . . . . ++++

Sämtliche eben angeführten Versuche lehren in schlagender Weise, daß die fixierende Substanz durch zwei Minuten dauerndes Kochen ganz und gar zerstört, die

immunisierende Substanz dadurch, wenn überhaupt, so doch jedenfalls nur äußerst wenig geschwächt wird.

Vielleicht könnte man in diesen Ergebnissen beim Kochen eine Analogie zu dem lange bekannten Verhalten finden, welches einzelne Toxine beim Erwärmen auf verhältnismäßig niedrige Temperaturen zeigen, indem sie in sogenannte Toxoide übergehen, welche keine Giftwirkung besitzen, aber noch Antitoxinbildung hervorrufen. Eine Parallelisierung dieser Phänomene ist aber nicht zulässig, denn beim Erwärmen der Toxine wird nicht die nach Ehrlich für die Antitoxinbildung notwendige haptophore, sondern die toxophore Gruppe des Toxins, die nach Ehrlich keine Bedeutung für die Auslösung der Antitoxinsekretion besitzt, zerstört. Sollte die Analogie mit unseren Ergebnissen zutreffen, so mußte das Toxin beim Erwärmen die haptophore Gruppe verlieren und trotzdem Bildung von Antitoxin hervorrufen. Eine solche Beobachtung liegt aber unseres Wissens nicht vor.

Theoretische Schlußbetrachtungen.

Welches Resultat unsere Untersuchungen in theoretischer Beziehung geben, ist schon angedeutet worden; wir gelangen zu dem Schluß, daß die Ehrlichsche Seitenkettentheorie in bezug auf die Hämolyse nicht mit den tatsächlichen Verhältnissen übereinstimmt.

Während der Drucklegung unserer vorläufigen Mitteilung erschien eine Arbeit von Friedberger und Moreschi[10]), welche auf Grund von Versuchen mit Typhusagglutinin und Typhuslysin zu einem ähnlichen Schlusse in betreff der Ehrlichschen Theorie führt. Vor allem scheint uns das Ergebnis ihrer Agglutininversuche beweisend.

Das Verhältnis ihrer Kultur „Gießen", welche nach Injektion Agglutinin sowohl für „Gießen" als für „Sprung" ergab, aber nur die erste, nicht die zweite absorbierte, kann kaum zu einem anderen als dem von dem Verfasser gezogenen Schlusse berechtigen. Dasselbe kann man auch über die „Sprung"-kultur sagen, welche nach der Injektion (Kaninchen 347) die Bildung außer eines „Sprung"lysins auch eines „Gießen"lysins veranlaßte, obwohl sie die letztere nicht absorbierte. Die Schwierigkeiten einer genauen Bestimmung des Grades der Lysinwirkung scheinen uns jedoch die Beweiskraft der Lysinversuche etwas abzuschwächen.

Es liegen also von mehreren Seiten Untersuchungen vor, welche die Grundlage der Ehrlichschen Theorie erschüttern. Es würde selbstverständlich ein viel größeres und umfassenderes Untersuchungsmaterial erfordern, als hier vorgeführt worden ist, um eine

neue Theorie an Stelle der Ehrlichschen aufzubauen. Aber schon jetzt drängte sich die Notwendigkeit auf, zu überlegen, ob man auf einem anderen Wege als dem von Ehrlich gewiesenen zu einer Auffassung derjenigen Immunitätsverhältnisse kommen kann, für welche die Ehrlichsche Erklärung nicht ausreicht. So sei uns wenigstens gestattet, einige biologische Tatsachen heranzuziehen, welche an jene erinnern, denen wir bei dem Immunitätsstudium begegnet sind und die vielleicht zu ihrer Erklärung geeignet sind.

In bezug auf die Hämolyse sind es vor allem zwei Fragen, welche Antwort heischen: einerseits die Amboceptorbildung und andererseits der Mechanismus des Vorganges bei der Hämolyse.

Nach unseren Erfahrungen entsteht der Amboceptor nach der Injektion eines Körpers, welcher, soweit man sehen kann, keine chemische Bindung mit dem Amboceptor selbst eingeht. Eine rein chemische Erklärung des Sekretionsmechanismus wie die Ehrlichs können wir nicht geben, wir müssen uns begnügen, auf gewisse Sekretionsphänomene zu verweisen, wo analoge Verhältnisse vorliegen. Stimmt man der Vorstellung zu, daß die Hämolyse als ein fermentativer Vorgang anzusehen ist, so liegt es nahe, unter den Fermenterscheinungen nach Analogien zu suchen. Wir möchten da an die Wirkung der sogenannten Kinasen (zymoplastische Substanzen, Sekretin) erinnern, welche eine physiologische Reaktion auslösen, obwohl sie nicht mit den Reaktionsprodukten (Enzymen) in Verbindung treten.

Der Mechanismus der Hämolyse wird von Ehrlich und seinen Schülern in der Art erklärt, daß der Receptor sich mit dem Amboceptor verbindet, an welchen letzteren sich weiter das Komplement, der eigentlich lösende Faktor, anlagert.

Abgesehen davon, daß es unwahrscheinlich ist, daß eine Substanz ihre fermentative Wirkung nur indirekt mit Hilfe eines anderen Körpers sollte ausüben können, glauben wir, daß unsere Untersuchungen eine andere Auffassung su stützen geeignet sind. Zwar ist richtig, daß frische, unverletzte Blutkörperchen nicht mit dem Komplement direkt, sondern nur nach vorangegangener Einwirkung des Amboceptors reagieren können. Sie enthalten aber doch, wie schon gezeigt worden ist, einen Bestandteil, den wir die neutralisierende Substanz genannt haben, welcher direkt mit dem Komplement reagiert, sich direkt damit verbindet.

Wenn nun ein solcher Bestandteil sich in den Blutkörperchen vorfindet, scheint es sehr wahrscheinlich, daß, nachdem der Amboceptor auf die Blutkörperchen eingewirkt und

hierdurch den Weg für das Komplement gebahnt hat (vielleicht durch Einwirkung auf die Lipoidmembran), das Komplement jetzt ebenfalls direkt mit der in den Blutkörperchen sich befindenden neutralisierenden Substanz reagiert, ohne dazu des Amboceptors als Zwischengliedes zu bedürfen.

Diese Auffassung stimmt mit Bordets Erklärung über den Vorgang bei der Hämolyse überein, nach welcher das Alexin direkt auf die Blutkörperchen einwirkt, während die Sensibilisatrice nur diese Einwirkung möglich macht.

Auch die relative Spezifizität der neutralisierenden Substanz den Komplementen gegenüber scheint uns für eine solche direkte Bindung zwischen der betreffenden Substanz und dem Komplement zu sprechen. Betrachtet man nämlich die Verhältnisse aus einem teleologischen Gesichtspunkte, dürfte diese Spezifizität vollkommen zwecklos erscheinen, wenn die Substanz nicht auch in der Natur mit dem Körper, gegen welchen die Spezifizität gerichtet ist, reagieren kann.

Aus den von uns erwähnten Versuchen über die Spezifizität der neutralisierenden Substanz geht weiter deutlich die Multiplizität der Komplemente im normalen Serum hervor, eine Auffassung, die von Ehrlich und seinen Schülern schon längst bewiesen worden ist.

Literatur.

[1]) v. Dungern, Globulicide Wirkungen des tierischen Organismus. Münchener med. Wochenschr. 1899.

[2]) Bordet, Les Sérums hémolytiques etc. Ann. de l'Inst. Pasteur. 1900.

[3]) Bierry et Pettit, Sur le pouvoir cytotoxique de certains Sérums, consécutif à l'injection de nucléoprotéides. Compt. rend. de la Soc. de biol. 1904.

[4]) Vaughan, V. C., Die intracellulären Toxine. Ref. in Centralbl. f. Bakt., Ref. 37.

[5]) Derselbe, Further studies of the intracellular Bacterian Toxins. The Journal of the Amer. Med Assoc. July—Dec. 1904, p. 643.

[6]) Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere. Tübingen 1901.

[7]) Pascucci, Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromes und die Hämolyse. Diese Beiträge 6.

[8]) Landsteiner und v. Eisler, Über die Wirkungsweise hämolytischer Sera. Wiener klin. Wochenschr. 1904.

[9]) Dieselben, Über Agglutinin- und Lysinwirkungen. Centralbl. f. Bakt. 39.

[10]) Friedberger und Moreschi, Über Rassendifferenzen von Typhusstämmen. Berliner klin. Wochenschr. 1905.

[11]) Bang und Forssman, Untersuchungen über die Hämolysinbildung. Vorl. Mitteilung. Centralbl. f. Bakt. 40.

Lund, 23. Februar 1906.

Kürzere Mitteilungen.

3. Über die Bildung des Adrenalins im Organismus.

Von **Walter L. Halle.**

Aus dem Laboratorium der L. Spiegler-Stiftung in Wien (Leiter: S. Fränkel).

Vorläufige Mitteilung.

Die Arbeiten von Takamine[1]), Aldrich[2]), v. Fürth[3]), Jowett[4]), Pauly[5]), Abderhalden und Bergell[6]) und Stolz[7]) berechtigten zur Annahme, daß dem Adrenalin die Bruttoformel $C_9H_{13}NO_3$ zukommt, die sich in eines der beiden folgenden Formelbilder auflösen läßt:

I. Benzolring mit OH, OH und $CH(OH).CH_2.NH(CH_3)$

II. Benzolring mit OH, OH und $CH.CH_2OH$ | $NH(CH_3)$

Jedoch lassen die Ergebnisse der Arbeiten John Abels[8]) Zweifel auftauchen, ob das natürliche Adrenalin des Tierkörpers wirklich als ein chemisches Individuum anzusprechen ist[9]). Sie werden gestützt durch die Differenz, welche im Verhalten und in der physiologischen Wirkung zwischen dem natürlichen, aus Nebennieren gewonnenen Adrenalin und einem synthetisch erhaltenen Körper besteht, dem die erste der oben angeführten Konstitutionsformeln zukommt. Der Körper wurde durch Einwirkung von Methylamin auf Chloracetobrenzkatechin und Reduktion des entstandenen Ketons dargestellt[10]). Dieser Körper

[1]) American Journ. of Pharmacy 73, 523.
[2]) American Journ. of Physiol. 5, 457.
[3]) Monatshefte f. Chemie 24, 261.
[4]) Proceedings Chem. Soc. 20, 18.
[5]) Berl. Ber. 36, 2944; 37, 1388.
[6]) Ebenda 37, 2022.
[7]) Ebenda 37, 4149.
[8]) Ebenda 36, 1839; 37, 368.
[9]) Journal of Biological Chem. 1, 1 (Abel u. Taveau).
[10]) D. R.-P. 157300 (Höchster Farbwerke).

ist aber mit dem Adrenalin nicht identisch, seine physiologische Wirkung ist nach O. Loewi und Hans Meyer[1]) eine ähnliche, jedoch viel schwächere. (Brenzkatechin allein vermag auch den Blutdruck zu erhöhen.) Doch ist zu bemerken, daß für die physiologische Untersuchung die Alkoholbase nicht in reinem Zustande vorlag, sowie daß die synthetische Substanz racemisch ist, die im Organismus enthaltene aber optisch aktiv, was ganz bedeutende Wirkungsdifferenzen zur Folge haben kann (s. Sigmund Fränkel, Ergebn. d. Physiol. 3, Biochemie, S. 291).

Wir haben im Adrenalin vielleicht ein Gemenge einer Reihe von chemisch ähnlichen Körpern des unter I. oben erwähnten Idealtypus vor uns. Diese Annahme erscheint verständlich, wenn man sich klar macht, auf welche Weise das Adrenalin im Organismus gebildet werden kann. Als mögliche Ausgangssubstanzen kommen nach unserer Ansicht in erster Linie zwei Körper, das Tyrosin und Phenylalanin, in Betracht. Nimmt man die unter I. aufgeführte hypothetische Konstitutionsformel Paulys als Grundlage der Diskussion an, so kann man sich die Umwandlung von Tyrosin in Adrenalin als eine Kombination von vier chemischen Prozessen denken.

1. Eine Oxydation, d. h. die Einführung einer zweiten Hydroxylgruppe in den Benzolkern, die dann, da die para-Stellung besetzt ist, in die ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe treten und das Tyrosin

$$\overset{OH}{\bigcirc}\underset{CH_2 . CH(NH_2) . COOH}{}$$

in eine o-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure

$$\overset{OH}{\bigcirc}{}^{OH}\underset{CH_2 . CH(NH_2) . COOH}{}$$

überführen würde.

2. Eine Kohlensäureabspaltung; aus der o-Dioxyphenyl-α-aminopropionsäure, $C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH(NH_2) . COOH$, entstünde ein o-Dioxyphenyläthylamin, $C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH_2 . NH_2$.

3. Eine Methylierung am Stickstoff; das o-Dioxyphenyläthylamin, $C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH_2 . NH_2$, ginge dabei in das Dioxyphenylmethyläthylamin, $C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH_2 . NH . CH_3$, über.

4. Eine Oxydation, d. h. die Einführung einer (OH)-Gruppe in die aliphatische Seitenkette:

$$C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . CH_2 . NHCH_3 \longrightarrow C_6H_3(OH)_2CH(OH) . CH_2 . NHCH_3.$$

---

[1]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 53, 213.

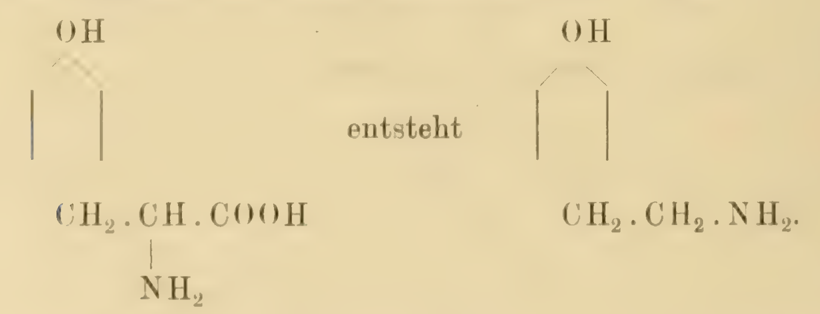
Vom Phenylalanin ausgehend müßte man sich die Einführung von zwei Hydroxylgruppen in den Kern denken, was jedenfalls komplizierter wäre, wofür sich aber in der Literatur ein Beispiel[1]) findet. Der Organismus ist bei einer bestimmten Stoffwechselanomalie, der Alkaptonurie, imstande, Phenylalanin

$$C_6H_5 . CH_2 . \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}} . COOH$$

in Homogentisinsäure, $C_6H_3(OH)_2 . CH_2 . COOH$ (Hydrochinonessigsäure), eine Dioxyhomobenzoësäure, überzuführen, was schon Baumann[2]) und seine Schüler früher für das Tyrosin nachgewiesen hatten. Weitere Beispiele für Einführung von Hydroxylgruppen in den Benzolkern sind das Auftreten von Phenol, Brenzkatechin und anderer Dioxybenzole[3]) im Harn bei Verfütterung von Benzol bzw. Phenol; ferner wird Naphtalin[4]) im Organismus in Oxynaphtalin und zum Teil in Dioxynaphtalin[5]) übergeführt. Die Reihe der Beispiele ist hiermit noch keineswegs erschöpft.

Beispiele für oben erwähnte Kohlensäureabspaltung im Organismus sind:

Von Nencki[6]) ist vermutet und von Spiro[7]) bewiesen worden, daß das bei der Zersetzung der Gelatine bei der Fäulnis mit Pankreas entstehende Phenyläthylamin durch Kohlensäureabspaltung aus dem Phenylalanin gebildet wird. Ferner hat Emerson[8]) bei der Selbstverdauung von Pankreas beobachtet, daß ein Teil des entstehenden Tyrosins in Oxyphenyläthylamin verwandelt wird. Aus



Für Methylierung am Stickstoff ist die Bildung von Methylpyridylammoniumhydroxyd

$$\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{C_5H_5N}} . CH_3$$

[1]) Falta und Langstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 513.
[2]) Wolkow und Baumann, ebenda 15, 228.
[3]) Pflügers Archiv 12, 148; Dubois' Archiv 1867, S. 340.
[4]) Berl. Ber. 19, 1534.
[5]) Lesnik, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 24, 164.
[6]) Journ. f. prakt. Chem. 26, 47.
[7]) Diese Beiträge 1, 349.
[8]) Ebenda 1, 501.

nach Verfütterung von Pyridin (His) ein gutes Beispiel. Ein weiteres Beispiel ist die von Hildebrandt[1]) beobachtete Methylierung am Stickstoff, die eintritt, wenn man Kondensationsprodukte von Piperidin mit Phenolen und Formaldehyd an Kaninchen verfüttert. Es treten hierbei Paarungen mit Glykuronsäure ein bei gleichzeitiger Methylierung am Stickstoff des Piperidinringes.

Es erübrigt noch, ein Beispiel für die Einführung einer Hydroxylgruppe in eine aliphatische Kette zu geben; nach Ad. Magnus-Lewi[2]) stammt die beim Coma diabeticum im Harn auftretende Oxybuttersäure aus dem Fett; das ist aber nur dann möglich, wenn eine Hydroxylgruppe in eine aliphatische Kette eintritt.

Man hat sich nun die kombinierte Wirkung dieser vier chemischen Prozesse auf das Tyrosin zu denken, um seinen Übergang in Adrenalin zu verstehen. Dabei ist es nun sehr wahrscheinlich, daß diese Synthese nicht ideal verläuft, d. h. daß sich in den Nebennieren nicht nur Adrenalin von der angegebenen einheitlichen Zusammensetzung, sondern auch Zwischenprodukte dieser Synthese sowie Nebenprodukte finden werden. Die Resultate der zitierten Arbeiten John Abels würden durch diese Theorie der Adrenalinbildung verständlich werden.

Wir haben versucht, durch Einwirkung der Fermente der Nebennieren die Umwandlung des Tyrosins in Adrenalin zu erzielen. Hofmeister[3]) hatte zwar die Abwesenheit eines methylierenden Enzyms in den Nebennieren für die tellurige Säure festgestellt, was wir bestätigen können. Eine Methylierung am Stickstoff durch Nebennieren, also die Anwesenheit eines spezifisch wirkenden Enzyms kann aber deshalb trotzdem angenommen werden. Unsere Versuche sind noch nicht völlig zum Abschlusse gediehen und werden unter veränderten Bedingungen fortgesetzt. Vorläufig ist es uns gelungen, in zwei von vier Fällen (aus einer Versuchsserie, in welcher uns diese vier Versuche als einwandfrei erscheinen) eine ziemlich bedeutende Vermehrung des Adrenalins durch Zusatz von Tyrosin zu erreichen. Die Versuche wurden bisher in folgender Weise durchgeführt: es wurden immer zwei gleichzeitig begonnen, einer mit Tyrosin, der zweite als blinder Kontrollversuch.

Je 300 g frische Ochsen- bzw. Schweinenebennieren wurden mehrmals durch die Fleischmaschine getrieben und gut durchgearbeitet; dann wurde in einer Portion 1 g fein pulverisiertes Tyrosin möglichst gut verteilt, je 100 ccm 0,9 proz. Kochsalzlösung und je 15 ccm Toluol zugesetzt und auf der Schüttelmaschine eine Viertelstunde geschüttelt. Der Kontrollversuch wurde in gleicher Weise ohne Tyrosinzusatz behandelt. Die Kolben wurden darauf mit steriler Watte geschlossen und sechs Tage bei 37° im Thermostaten gelassen. Nach diesem Zeitraume wurden die Versuche nach der Vorschrift John Abels[4]) so schnell und so quantitativ als möglich in folgender Weise aufgearbeitet: Zu den einzelnen Portionen wurden je 140 ccm einer 4 proz. Lösung von Trichloressigsäure in absolutem Alkohol, und zwar jeweils nur

[1]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **44**, 278.
[2]) Ebenda **42**, 149 bis 237.
[3]) Ebenda **33**, 194.
[4]) Berl. Ber. **36**, 1841 (1903).

in kleinen Mengen zugesetzt. Nach jedem Zusatz wurde heftig geschüttelt. Die Mischung wurde 12 Stunden stehen gelassen, filtriert und mehrmals mit einer 2 proz. Lösung von Trichloressigsäure in absolutem Alkohol nachgewaschen. Die Filtrate wurden im Vakuum auf 50 ccm eingeengt und von einem Niederschlag abfiltriert. In das klare Filtrat wurde hierauf konzentriertes Ammoniak allmählich eingetragen und das kristallinische Pulver sofort filtriert, gründlich mit Wasser, dann mit Alkohol und Äther gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Die Produkte waren in allen Fällen ziemlich aschereich, doch der Aschegehalt bei allen Versuchen stets der gleiche. Wir erhielten:

1. Aus 300 g Schweinenebennieren:

   beim Versuch mit Tyrosin 0,2436 g Adrenalin,
   „ „ ohne „ 0,2138 g „

2. Aus 300 g Ochsennebennieren:

   beim Versuch mit Tyrosin 0,1345 g Adrenalin,
   „ „ ohne „ 0,1012 g „

Im ersten Falle eine Vermehrung um etwa 14 Proz., im zweiten Falle um etwa 33 Proz.

Wir glauben keinesfalls, mit dieser Arbeit einen stringenten Beweis für unsere Theorie der Adrenalinbildung erbracht zu haben, setzen jedoch die Versuche in der Weise fort, daß wir das methylierende Ferment der Hoden, die oxydierenden und Kohlensäure abspaltenden des Pankreas mit denen der Nebennieren kombiniert, auf Tyrosin einwirken lassen.

Nachtrag. In einer eben erschienenen Publikation von E. Friedmann: „Die Konstitution des Adrenalins“ [1]), spricht Friedmann die Vermutung aus, daß das Adrenalin vielleicht von einem Oxyphenylserin oder von einem Oxyphenylmethylserin abstammt, welche Substanzen möglicherweise in einigen Eiweißkörpern vorgebildet sein könnten. Es erscheint uns hierzu notwendig, zu bemerken, daß diese Vorstellung bislang keine experimentelle Stütze hat und nur auf einer Hilfshypothese beruht, während unsere experimentell gestützte Anschauung sich auf Tyrosin als Grundsubstanz bezieht, das ja bekanntlich als Spaltungsprodukt der meisten Eiweißkörper auftritt.

[1]) Diese Beiträge 8, 95.

4. Über das fettspaltende Ferment im Sekret des „kleinen Magens“.

Von **Ernst Laqueur.**

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg.

Ein Hund mit Pawlowschem kleinem Magen stand dem Institute zur Verfügung und diente zu anderweitigen Untersuchungen. Auf Anregung von Herrn Prof. Magnus benutzte ich die Gelegenheit, Volhards Beobachtungen über die Fettspaltung im Magen zu bestätigen und zu ergänzen.

Volhard [1]) hat mehrfach beschrieben, daß emulgiertes Fett von menschlichem Mageninhalt, sowie von Extrakten tierischer Magenschleimhaut gespalten wird. Er versuchte auch nachzuweisen, daß diese Spaltung auf der Tätigkeit eines Fermentes beruhe, das von der Magenschleimhaut in das Innere des Magens sezerniert wird, und daß es mit den anderen Magenfermenten in Analogie gesetzt werden könne.

Indessen besteht die Möglichkeit, daß die Fettspaltung, insoweit sie in den Extrakten nachgewiesen ist, durch ein intrazelluläres Gewebsferment hervorgerufen wird, insoweit sie im menschlichen Mageninhalt gefunden wird, aber durch Pankreas- oder Darmsaft bedingt ist, der in den Magen gelangt. Denn es ist durch Versuche von Boldireff [2]) in Pawlows Laboratorium gezeigt worden, daß bei Anwesenheit von Fett im Magen ein Gemisch von Pankreas-Darmsaft und Galle aus dem Duodenum in den Magen übertritt und „daß bei fetter Speise die Verdauung im Magen hauptsächlich mittels der Pankreasfermente geschieht“. Tatsächlich ist auch die Volhardsche Fettspaltung im menschlichen Magen erst wieder kürzlich ausschließlich auf die Wirkung von Pankreassteapsin bezogen worden [4]).

Die Untersuchung des Sekretes des „kleinen“ Magens beim Hunde hat nun ergeben, daß wirklich mit dem Magensaft ein fettspaltendes Ferment sezerniert wird.

Bei nochmaliger Durchsicht der Volhardschen Veröffentlichungen fand sich unter hunderten anderer Versuche, die mit Schleimhautextrakt oder ausgehebertem Magensaft angestellt worden waren, ein einziger [1b]) mit dem Sekret eines „kleinen“ Magens.

Der von mir benutzte Hund mit „kleinem“ Magen, welchen Herr Prof. Cohnheim im hiesigen physiologischen Institut die Freundlichkeit hatte zu operieren, befand sich während der ganzen Zeit der Versuche in bester Verfassung.

Der innerhalb der ersten 4 Stunden nach der Fütterung in bekannter Weise aufgefangene Saft wurde filtriert oder nur durch Glas-

wolle gegossen. Es ergab sich eine meist wasserhelle, manchmal opaleszente Flüssigkeit von durchschnittlich 0,36 Proz. HCl; zu den einzelnen Versuchen wurden 0,9 bis 2,5 ccm Saft benutzt.

Immer wurden Kontrollproben mit gekochtem Saft zur Vergleichung aufgestellt.

Zum Nachweis der Fettspaltung benutzte ich die von Volhard ausgearbeitete, kürzlich wieder von Fromme[3]) beschriebene Methode. Im allgemeinen diente Eigelbemulsion (3 Gelbeier auf 100 Wasser) als Prüfungsobjekt.

Aus zahlreichen Versuchen hat sich ergeben, daß von dieser Emulsion bei 4- bis 15stündigem Aufenthalte im Brutschranke im Minimum 1,9, im Maximum 33,45 Proz., durchschnittlich etwa 20 Proz. des im ganzen vorhandenen Fettes gespalten werden.

Die Zahlen sind erhalten, indem von den Werten, die sich bei Versuchen mit nativem Magensaft ergeben hatten, die Zahlen abgezogen wurden, die bei Versuchen mit gekochtem Safte gefunden waren.

So hohe Werte, 50 bis 60 Proz., wie sie Volhard bei Versuchen im menschlichen Magen gefunden hatte, konnte ich bei reinem Hundemagensaft niemals nachweisen; auch Volhard hatte in dem mit solchem Sekret angestellten Versuche nur etwa 12 Proz. gefunden. Die mangelnde Durchmischung bei Brutschrankversuchen ist wohl nicht Ursache der Differenz, denn die Spaltung war in Versuchen, in denen ich einen Teil der Proben während des Aufenthaltes im Brutschrank durch einen Motor schütteln ließ, in den bewegten Proben nur um 1,8 Proz. größer als in den stillstehenden (18,5 Proz. gegen 16,7 Proz.).

Auffällig ist, daß nach sehr fettreicher Nahrung (250 g Fleisch, 200 g Fett) die Fettspaltung niedriger war als bei Fütterung mit Hundekuchen.

Daß wirklich ein Ferment und nicht Bakterien die Ursache der lipolytischen Fähigkeit sind, hatte schon Volhard durch Versuche mit filtrierten, sterilen Schleimhautextrakten gezeigt; bestätigt wurde dies Ergebnis durch Versuche, in denen die Eiemulsion mit Wasser, das reichlich Toluol enthielt, bereitet wurde: die Spaltung trat auch hier

Nr.	Magensaft ccm	Art der Emulsion ccm	In ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge: I — 1. Titration. Durch Ferment u. Magensäure abgespaltene Fettsäuren	II — 2. Titration. Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Ätherextrakt	In Proz. gespalten: $\frac{I \cdot 100}{I + II}$ Proz.	Durch Ferment gespalten: nach Abzug der Werte für die gekochte Probe Proz.
1.	2,0 gekocht	10 mit Aq. dest. bereitet	1,15	15,3	16,45	7,0	—
2.	2,0 roh	desgl.	5,05	12,35	17,4	29,0	22,0
3.	2,0 „	10 mit Toluolwasser bereitet	2,74	13,45	16,19	16,95	9,95

ein, war allerdings gegenüber der Spaltung in der gewöhnlichen Emulsion geringer.

Daß die Spaltung in der Toluolprobe hinter der mit gewöhnlichem Wasser zurückblieb, daß sie, wie weitere Versuche zeigten, gänzlich aufhörte, wenn Toluol im großen Überschusse (5 ccm auf 10 ccm Emulsion) hinzugefügt wurden, liegt an der Verringerung bzw. Aufhebung der Emulgierung.

Die Feinheit der Emulsion ist wohl überhaupt das Entscheidende, ob Spaltung eintritt oder nicht.

Versuche mit einer aus Olivenöl bereiteten Emulsion (2 Tle. Öl, 1 Tl. Gummi arab., 17 Tle. Wasser), die ziemlich grob ist, ergaben ebenso wie Versuche mit reinem Olivenöl gar keine Spaltung (direkte Bestimmung freier Fettsäuren durch $^1/_{20}$ n-Barytlauge). Scotts Lebertranemulsion, die von mittlerer Feinheit ist, wurde nur zu 1 Proz. gespalten, während die soviel besser gespaltene Eiemulsion mikroskopisch ganz erheblich feiner ist.

Nr.	Magensaft ccm	Art der Emulsion	In ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge: I: 1. Titration. Durch Ferment u. Magensäure abgespaltene Fettsäuren	II: 2. Titration. Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Ätherextrakt	In Proz. gespalten: $\frac{I \cdot 100}{I + II}$ Proz.	Durch Ferment gespalten: nach Abzug der Werte für die gekochte Probe Proz.
1.	1,0 gekocht	10 ccm Eiemulsion	0,9	23,0	23,9	3,76	16,04
2.	1,0 roh	desgl.	4,75	19,25	24,0	19,8	
3.	1,0 gekocht	2 g Scotts Emulsion + 5,0 ccm Aq. dest.	0,33	9,40	9,73	3,39	1,04
4.	1,0 roh	desgl.	0,38	8,20	8,58	4,43	

Es ließ sich weiter zeigen, daß es wirklich nur der Grad der Emulgierung ist, welcher dem natürlich vorkommenden Eifett seine besondere Stellung gegenüber der Magenlipase gibt, und nicht etwa seine chemische Natur; denn dasselbe Eierfett unterschied sich, wenn es in gröberer Emulsion zu den Versuchen benutzt wurde, gar nicht von den anderen Fetten. Extrahierte man nämlich Eiemulsion mit Äther, vertrieb diesen vollständig, und setzte zu dem erhaltenen Rückstande Wasser und Magensaft, schüttelte gut durch, so trat nur eine Spaltung von etwa 0,5 Proz. ein. Im Mikroskop ergab sich dann, daß die aus dem Rückstande durch das Schütteln erhaltene Emulsion Fettkügelchen von etwa der gleichen Größe zeigte wie die oben erwähnte Scottsche.

Im Gegensatz zur Lipase des Pankreas und in Übereinstimmung mit der des Darmsaftes (Boldireff) wird das fettspaltende Ferment des Magensaftes durch Gegenwart von Galle kaum in seiner Wirkung gesteigert.

Nr.	Magensaft	Art der Emulsion	Frische Hundegalle	In ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge: I. 1. Titration. Durch Ferment u. Magensäure abgespaltene Fettsäuren	In ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge: II. 2. Titration. Durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	In ccm $^1/_{10}$ n-Natronlauge: Summe der Fettsäuren in 50 ccm Ätherextrakt	In Proz. gespalten: $\frac{I . 100}{I + II}$	Zunahme der Spaltung durch Gallenzusatz
	ccm	ccm	ccm				Proz.	Proz.
1.	2,0 Saft	10 Eiemulsion mit Aq. dest. bereitet	—	5,05	12,35	17,4	29,0	1,2 (Nr. 1 u. 2)
2.	2,0 „	desgl.	0,1	5,15	11.95	17,1	30,2	
3.	2,0 „	10 Eiemulsion mit Toluol gesättigt. Wasser	—	2,74	13,45	16,19	16,95	0,23 (Nr. 3 u. 4)
4.	2,0 „	desgl.	0,25	2,9	14,1	17,0	17,18	
5.	0,0 „	10 Eiemulsion mit Aq. dest. bereitet	0,25	0,85	16,35	17,2	4,95	—

Eine halbstündige Einwirkung bei 51° genügt bereits, um das Ferment zu zerstören. Versuche, dies so behandelte Ferment durch Hundegalle zu reaktivieren, mißlangen.

Zusammenfassend können wir sagen:

Das von Volhard im Magen entdeckte, feinste Fettemulsionen spaltende Ferment wird beim Hunde mit dem Magensaft sezerniert. Seine Wirkung wird durch Galle kaum gesteigert.

Literatur.

[1]) F. Volhard, a) Münch. med. Wochenschrift 1900, Nr. 5 u. 6. — b) Zeitschr. f. klin. Med. **42**, Heft 5 u. 6 (1901). — c) Ebenda **43**, Heft 5 u. 6 (1901).

[2]) W. N. Boldireff, Zentralbl. f. Physiol. **18**, Nr. 15 (1904).

[3]) A. Fromme, Diese Beiträge **7**, 51 (1905). — Ebenda S. 50 u. S. 76 die übrige Literatur über die Lipase des Magens.

[4]) E. Meyer, Münch. med. Wochenschrift 1906, Nr. 12, S. 577.

Beiträge

zur

Chemischen Physiologie

und

Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

VIII. Band 8. bis 10. Heft

(Ausgegeben Juli 1906)



Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1906

Inhalt des 8. bis 10. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie" erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge" soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen" kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

XV.

Über die „freie Salzsäure“ des Magensaftes.

Von Prof. Dr. med. **H. Dreser** (Elberfeld).

Man bestimmt herkömmlicherweise die „freie Salzsäure“ im Magensaft durch Titration mit Tüpfeln auf Kongopapier. Die folgenden Versuche bezweckten, festzustellen, ob diese mittels Kongo als „freie“ erkannte Säure des Magensaftes in ihrer chemischen Wirksamkeit auch wirklich identisch ist mit einer auf Grund der Kongotitration gleich stark verdünnten Salzsäure.

Bleibt bei einer Titration die Bläuung des roten Kongopapiers bei dem zuletzt zugesetzten Tropfen $^1/_{10}$ n-Natronlauge aus, so besagt dies lediglich, daß die Anzahl der Wasserstoffionen pro Liter Magensaft oder verdünnte Säure jetzt auf einen Betrag heruntergebracht worden ist, der nach Friedenthal[1]) kleiner als $5 . 10^{-5}$ ist, was einer 0,00005 n-HCl entspräche. Demnach vermag die Titrationsmethode nur die Quantität der Säure zu bestimmen, aber nicht, wie hoch ursprünglich der Wasserstoffionengehalt des Magensaftes war. Dieser ist aber das Maß seiner chemischen Aktivität.

Das scheinbar Nächstliegende wäre daher die Messung der Wasserstoffionenkonzentration im Magensafte mit Hilfe von Wasserstoffgasketten. Die zu derartigen Messungen dienende Poggendorff-Ostwaldsche Methode gewährt sogar den Vorteil, gerade die initiale Intensität des Magensaftes kennen zu lernen, mit der er chemische Arbeit verrichten kann. Bei dieser Methode wird nämlich ein stärkerer elektrischer Strom dem aus der Gaskettenkombination zwischen dem zu messenden Magensaft und einer Salzsäure von bekanntem Titre resultierenden Konzentrationsstrom entgegengesetzt geschaltet und in genau meßbarer Weise soweit

---

[1]) Zeitschr. für Elektrochemie und angew. physikal. Chemie, 10. Jahrg., 1904, S. 113 ff. Der Lackmusneutralität entspricht nach Friedenthals Tabelle (S. 117) ungefähr ein H-Ionengehalt von $1 . 10^{-7}$, und der beginnenden Rosafärbung des Phenolphtaleïns ein solcher von $1 . 10^{-10}$.

abgeschwächt, daß er den zu messenden Konzentrationsstrom kompensiert. Chemische Arbeitsleistung, wie bei Neutralisation oder Zersetzung, ist dabei unmöglich gemacht.

Die Messungen mit Hilfe von Wasserstoffgaselektroden lassen sich nach Böttiger[1]) bis auf eine Genauigkeit von 3 Millivolt treiben, denn zwei in gleich konzentrierte Säure getauchte Elektroden wiesen keine Potentialdifferenz auf, die im allgemeinen größer war als drei Millivolt. Um die mittels der Gasketten erreichbare Genauigkeit kennen zu lernen, berechnen wir mit Hilfe der Nernstschen Formel für Konzentrationsketten die durch einen Beobachtungsfehler von 0,003 Volt bedingte Differenz. In der allgemeinen Formel für die elektromotorische Kraft π solcher Ketten ist, da es sich um HCl handelt, einzusetzen bei 17° C. $T = 290°$, für $\pi = 0{,}0002 \frac{U-V}{U+V} T \times lg \frac{p_1}{p_2}$ Volt, $u = 0{,}00352$ (Wanderungsgeschwindigkeit des H), für $v = 0{,}00069$ (Wanderungsgeschwindigkeit des Cl). Für diese konkreten Werte von u, v und T wird der $lg \frac{p_1}{p_2}$ multiplizierende Faktor zu 0,039; p_1 und p_2 sind die miteinander zu vergleichenden Normalitäts- oder Konzentrationsgrade von Salzsäure; sind p_1 und p_2 einander gleich, folglich $\frac{p_1}{p_2} = 1$, so ist $lg \frac{p_1}{p_2} = lg\ 1 = 0$; π also auch gleich 0, wenn die beiden Gaselektroden in gleich starke Salzsäure eintauchen. Adhäriert aber dem Messungsverfahren eine unvermeidbare Abweichung von 0,003 Volt, so bedingt dies in der Berechnung von $lg \frac{p_1}{p_2}$ aus dem Ansatz $0{,}003 = 0{,}039 \cdot lg \frac{p_1}{p_2}$ für das Verhältnis $\frac{p_1}{p_2}$ den Wert 1,1938, das ist eine Differenz von rund 20 Proz. des zu ermittelnden Wertes. Die Methode der Messung der elektromotorischen Kraft ist zwar für die annähernde Bestimmung, nicht aber für die genaue Ermittelung sehr geeignet.

Schon im Jahre 1880 hat Ostwald[2]) mittels des heterogenen Systems: saure Flüssigkeit gegen festes, in reinem Wasser unlösliches Salz, die Stärke sehr verschiedener Säuren in besonders ausgedehnten Versuchsreihen ermittelt; als unlösliches Salz benutzte

[1]) Böttiger, Die Anwendung des Elektrometers als Indikator beim Titrieren von Säuren und Basen. Zeitschr. f. physikal. Chem. 24, 260 (1897).
[2]) Journ. f. prakt. Chem., N. F., 22, 251; 23, 517.

er mit Vorliebe das Calciumoxalat; die von der zu messenden Säure vermöge ihrer Avidität aufgelöste Menge oxalsauren Kalks bestimmte er durch Titration der in Lösung befindlichen Oxalsäure mittels Kaliumpermanganat. In meinen Versuchen über die Avidität von Magensäften, die ich etwa eine halbe Stunde nach dem Genuß des aus Tee mit geriebener, getrockneter Semmel bestehenden „Probefrühstücks“ ausgehebert hatte, war sowohl die Titration der Oxalsäure mit Permanganat wegen der organischen Substanzen des Mageninhaltes unzulässig, als auch die Bestimmung des in Lösung befindlichen Kalks wegen der in dem Probefrühstück und dem verschluckten kalkhaltigen Speichel bereits eingeführten Kalksalze. Ich benutzte deshalb die Barytsalze der Oxalsäure und der Chromsäure als in Wasser unlösliche und von der Säure des Magensaftes zu zersetzende Salze („Bodenkörper“). Beim Freiwerden der Chromsäure aus ihren Salzen ist es sehr wahrscheinlich, daß sich unmittelbar die Mono-Chromsäure (H_2CrO_4) in die Dichromsäure ($H_2Cr_2O_7$) umwandelt, worauf Ostwald[1]) 1888 hinwies.

Die Untersuchung der nach dem Probefrühstück ausgeheberten und filtrierten Magensäfte gestaltete sich folgendermaßen: Zunächst wurde in der herkömmlichen Weise die Acidität durch Tüpfeln auf Kongopapier mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge titriert; entsprechend dem hierdurch ermittelten Gehalt an „freier“ Salzsäure wurde eine 0,1 normale Salzsäure entsprechend mit Wasser verdünnt und diese Verdünnung zur Kontrolle ebenfalls gegen dieselbe $^1/_{10}$ n-Lauge durch Tüpfeln mit Kongopapier titriert. Auf diese Bestimmung der Acidität folgte die Vergleichung der „Avidität“ der Magensaftsäure mit der zugehörigen, auf dieselbe Acidität gegen Kongo verdünnten Salzsäure, indem zu beiden Flüssigkeiten als „Bodenkörper“ die in reinem Wasser unlöslichen Salze Baryumchromat oder in anderen Versuchen Baryumoxalat in einem hinreichenden Überschuß zugesetzt wurden, so daß nach mindestens halbstündigem Schütteln am Schüttelapparat noch reichlich ungelöstes Salz übrig war. Alsdann wurden beide zu vergleichende Flüssigkeiten klar filtriert und der in einem genau abgemessenen Volum (wenn möglich 50 ccm) aus dem unlöslichen Salze in Lösung übergeführte Baryt als Sulfat bestimmt und prozentisch die Baryumsulfatmenge aus jedem Magensaft mit derjenigen aus der zugehörigen Salzsäure verglichen.

---

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chemie. 2, 78.

Durchführbar ist diese Methode nur, wenn die saure Flüssigkeit, deren Avidität geprüft werden soll, keine Schwefelsäure enthält, denn diese würde ihr Äquivalent Baryum aus dem durch die Salzsäure zersetzten Baryumchromat oder Baryumoxalat wieder ausfällen und da dieses $BaSO_4$ zusammen mit dem ungelöst gebliebenen Bodenkörper abfiltriert wird, so fällt der Barytgehalt des Filtrates zu gering aus und die daraus zu berechnende Avidität ebenfalls. Nach den Analysen von C. Schmidt[1]) über die Zusammensetzung des menschlichen Magensaftes ist aber Schwefelsäure darin nicht einmal in Spuren enthalten. Ich überzeugte mich indessen noch besonders, daß eine Filtratprobe des Probefrühstücks und ebenso der filtrierte Magensaft keine Spur von Schwefelsäurereaktion gaben; bei Patienten, die Karlsbadersalz oder andere Sulfate kurmäßig gebrauchen, wäre diese Aviditätsmessung mit Hilfe von Baryumsalzen ebenso unstatthaft, wie wenn man die Avidität des sauren Speichels von Dolium galea (Faßschnecke) damit ermitteln wollte, der etwa $^1/_2$ Proz. HCl neben 2,5 Proz. H_2SO_4 enthält.

Auch der arzneiliche Gebrauch von Jodkalium, das im Speichel zum Teil wieder ausgeschieden wird, könnte die Aviditätsmessung mittels Baryumchromat dadurch unrichtig machen, daß das mit dem verschluckten Speichel in den Magensaft gelangte Jodalkali als Jodwasserstoffsäure einen Teil der in Lösung gegangenen Chromsäure zu Chromoxyd reduzierte; dadurch wäre das Gleichgewicht wegen Vernichtung eines Teiles Chromsäure in der Lösung zunächst gestört im Sinne einer Auflösung von mehr Baryumchromat, als der Avidität ursprünglich zukäme. Da aber das durch Reduktion entstandene Chromoxyd zu seiner Lösung eines Teiles der vorhandenen Salzsäure bedarf, so wird dadurch die noch zersetzende Salzsäure in ihrer Quantität vermindert und die bei Gegenwart von JK mittels Ba-Chromat gemessene „Avidität" einer bekannten Salzsäure fiel immer zu klein aus.

In der ersten der folgenden Tabellen ist Baryumchromat als Bodenkörper benutzt worden, in der zweiten Baryumoxalat. Der erste Stab jeder Tabelle drückt das Ergebnis der Titration bis zur Neutralität gegen Kongo in Normalitätszahlen von Salzsäure aus; der zweite Stab gibt das prozentische Verhältnis der vom Magensaft in Lösung übergeführten Barytmenge zu der von der korrespondierenden Salzsäure, gelösten Menge (= 100 Proz.). Der dritte

[1]) Bidder und Schmidt, Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel, S. 61 ff., Mitau und Leipzig 1853.

Stab gibt das Verhältnis der Aviditäten der Säure des Magensaftes und der korrespondierenden Salzsäure, letztere wieder gleich 100 Proz. gesetzt. Auf die Berechnung des Aviditätsverhältnisses aus dem Gewichtsprozentverhältnis wird erst später eingegangen werden.

I. Baryumchromat			II. Baryumoxalat		
Normalität der Magensaftproben	Gewichtsprozentverhältnis v. $BaSO_4$ Magensaft : $BaSO_4$ (HCl) Prozent	Aviditätsprozentverhältnis, Magensaft : HCl	Normalität der Magensaftproben	Gewichtsprozentverhältnis v. $BaSO_4$ Magensaft : $BaSO_4$ (HCl) Prozent	Aviditätsprozentverhältnis, Magensaft : HCl
0,03	85,2	68,54	0,054	91,8	74,14
0,028	81,1	61,14	0,04	96,7	88,63
0,031	95	88,47	0,05	94,0	80,39
0,01	24,5	4,61	0,048	92,1	74,96
0,036	89,5	76,87	0,024	76,6	42,22
0,035	90,5	78,9	0,029	81,7	50,28
0,054	90,8	79,52	0,039	92,0	74,69
0,04	87,2	72,33	0,020	95,2	83,92
0,05	98	95,28	0,023	97,6	91,59
0,048	95,2	88,92	0,031	93,4	78,59
0,044	80,8	60,62	—	—	—
0,046	90,8	79,52	—	—	—
0,029	48	19,07	—	—	—
0,033	70,4	44,31	—	—	—

Das Gewichtsprozentverhältnis der durch den sauren Magensaft in Lösung gebrachten Baryummenge zu derjenigen, welche die auf den gleichen Kongotitre verdünnte Salzsäure aufzulösen vermochte, drückt die Analysenergebnisse in einer unmittelbar vergleichbaren Zahl aus. Das im dritten Stab der Tabelle angegebene Aviditätsverhältnis ist erst aus dem Gewichtsprozentverhältnis in folgender Weise in Prozenten der Avidität der reinen Salzsäure berechnet worden. Die Anwendung des Guldberg-Waageschen Massenwirkungsgesetzes führt in unserem konkreten Beispiel zu folgender Überlegung: Nach Eintritt des Gleichgewichtszustandes in der Lösung müssen die in der Zeiteinheit durch Einwirkung der Salzsäure aus dem unlöslichen Bodenkörper sich lösenden Mengen von Baryum und Chromsäure (bzw. Oxalsäure) immer den Mengen, die sich aus der Lösung wieder als unlösliches Salz abscheiden, gleich sein. Bezeichnet man, auf Äquivalent bezogen, die vor Beginn der Reaktion, d. h. vor dem Eintragen des Bodenkörpers, vorhandene Säuremenge mit 1, so ist nach Eintritt des Gleichgewichtszustandes ein Bruchteil $= x$ Äquivalente in Chlorbaryum übergegangen; als Rest von freier Salzsäure bleibt $1 - x$ Äquivalent übrig. Dagegen enthält die Flüssigkeit von dem teilweise in Lösung übergeführten Bodenkörper x Äquivalent Baryum und x Äquivalent Chromsäure bzw. Oxalsäure. Das gelöste Baryum würde sich mit der in Lösung befindlichen

Chrom- oder Oxalsäure sofort wieder zu unlöslich ausfallendem Ba-Salz vereinigen, sobald der dies hindernde Einfluß der noch freien Salzsäure weggeräumt würde, etwa durch Neutralisation. Nennen wir nun das Auflösungsbestreben der Salzsäure c und das Wiederausfallenbestreben der gelösten Bestandteile des Bodenkörpers c_1, so finden in jedem Zeitteilchen innerhalb der Lösung folgende zwei einander entgegengesetzte und, da sie sich zum Gleichgewichtszustand aufheben, ihrem absoluten Werte nach gleiche Prozesse statt. Die restierende Salzsäure $1 - x$ wirkt mit ihrem Lösungsbestreben c auf den überschüssigen Bodenkörper ein, der sich aus seinem Vorrat immer wieder ergänzt und daher als konstant $= h$ angesehen wird[1]). Die Lösungsleistung der Salzsäure beträgt $c.(1 - x).h$. Ihr arbeitet entgegen, sie gerade kompensierend, die Wiederausfällung mit der Tendenz c_1 von x Äquivalent Baryum auf x Äquivalent Chrom- oder Oxalsäure, also $c.x.x = c_1.x^2$. Da sich Lösung und Fällung gegenseitig annullieren, muß sein $c.h.(1 - x) = c_1 x^2$ oder $\frac{c.h}{c_1} = \frac{x^2}{1 - x}$. In unserem Falle handelt es sich darum, den c-Wert des sauren Magensaftes mit dem c-Werte der zugehörigen Salzsäure zu vergleichen. Das Mittel gibt uns hierzu die analytische Bestimmung des gelösten Äquivalents x von Baryum an die Hand, x ist durch die Analyse bekannt; von ihm hängt die Beschaffenheit des Wertes $\frac{c\,h}{c_1}$ ab. Da h und c_1 konstant bleiben, wenn wir auch ihren absoluten Wert nicht kennen, bezeichnen wir den wegen c abhängig veränderlichen Ausdruck $\frac{c\,h}{c_1}$ kurz mit y. Schreiben wir die Gleichung $y = \frac{x^2}{1 - x}$ in der Form $x^2 - y + xy = 0$, so erkennen wir, daß eine Kurve zweiten Grades vorliegt. Das Auftreten des Gliedes $x.y$ ist bei diesen Kurven ein bekanntes Kennzeichen für eine Drehung ihres Koordinatensystems[2]).

---

[1]) **Ostwald** betonte bereits die aus seinen Versuchen hervorgehende Tatsache, daß die Konzentration der angewandten Säure auf deren Aviditätsverhältnis **ohne** Einfluß sei. Eine Änderung der Konzentration der einwirkenden Säure auf das m-fache würde an der Aviditätsformel folgende Änderung bedingen: Da die Zahl $1 = m$ wird, muß x zu mx werden; folglich $\frac{m^2 x^2}{m - mx} = \frac{c\,h}{c_1}$; damit wäre aber das neue Aviditätsverhältnis m-mal größer als das alte, also von der Konzentration abhängig. Dieser Widerspruch mit dem Experiment klärt sich dadurch auf, daß h nicht unveränderlich mit der Konzentration ist, sondern ihr direkt proportional. Setzen wir in der neuen Gleichung mh statt h, so stimmt die Rechnung mit der Erfahrung. Sofort klar ist dieses der Konzentration proportionale Verhalten von h, wenn wir unter h die Wiederbildungstendenz zu dem unlöslichen Bodenkörper aus den Bestandteilen der Lösung verstehen, wie sie etwa bei Abkühlung des Systems sichtbar wird; es ist selbstverständlich, daß aus einer m mal konzentrierten Lösung bei gleicher Abkühlung auch die m-fache Menge Bodenkörper, also mh statt h sich regenerieren würde.

[2]) Unsere die Gleichung $x^2 + xy - y = 0$ darstellende Kurve muß eine Hyperbel sein, gemäß der in der analytischen Geometrie gelehrten Merkmale für die allgemeinste Gleichung der Linien zweiten Grades: $Ax^2 + By^2 + 2\,Cxy + 2\,Dx + 2\,Ey + F = 0$; sie geht in unsere Kurve über,

Für die Aviditätsmessung kommt nur der Teil der Kurve in Frage, welcher die innerhalb der Grenzen $x = 0$ und $x = 1$ belegenen y-Werte enthält. Würde man Baryumsulfat als Bodenkörper wählen, so wäre wegen des unendlich großen Vereinigungsbestrebens (von Ba und SO_4) auch die in Salzsäurelösung aufgenommene Menge unwägbar, also $x = 0$; wählten wir dagegen Baryumcarbonat als Bodenkörper, so wäre für die meisten Säuren x nicht merkbar von 1 verschieden. Die besten Chancen als Bodenkörper bieten für die analytische Bestimmung solche unlösliche Barytsalze, für die der charakteristische Wert $\frac{h}{c_1}$ (Verhältnis der Lösbarkeit h zur Wiederausfällungstendenz c_1) weder zu klein ist, so daß er wie beim Baryumsulfat überhaupt nicht meßbar ist, noch zu groß, so daß er wie beim Baryumcarbonat keine deutlich meßbaren Unterschiede mehr ergibt.

Als Baryumsalze von geeigneter Zersetzbarkeit wählte ich den chromsauren und den oxalsauren Baryt. Die charakteristischen Werte $\frac{h}{c_1}$ für jedes der beiden Salze ermittelte ich, indem ich dieselbe Salzsäure (0,1-normal) sich damit ins Gleichgewicht setzen ließ. Aus Baryumchromat und 0,1 n — HCL erhielt ich bei 18° C auf 20 ccm Filtrat berechnet 0,06672 $BaSO_4$ und für Baryumoxalat bei 18° C auf 20 ccm Filtrat 0,14584 $BaSO_4$. Diese Werte sind für x in der obigen allgemeinen Gleichung zu substituieren;

---

wenn der Koeffizient $A = 1$, $B = 0$, $C = \frac{1}{2}$, $D = 0$, $E = \frac{1}{2}$ und $F = 0$ ist. Für den Charakter des durch eine Gleichung zweiten Grades dargestellten geometrischen Gebildes sind zwei aus obigen Koeffizienten zusammengesetzte Zahlen besonders wichtig, nämlich Γ und die Diskriminante Δ. Wenn keine dieser beiden Zahlen verschwindet ($\Delta = 0$ charakterisiert eine Parabel), so geben ihre Vorzeichen darüber Aufschluß, ob die Kurve eine Ellipse oder Hyperbel ist. $\Delta = C^2 - AB$ ist in unserem Falle $= + \frac{1}{4}$;

$$\Gamma = B \cdot D^2 + AE^2 - 2\,CDE + F\Delta$$

in unserem Falle $\Gamma = 0 + \frac{1}{4} - 0 + 0$. Das positive Vorzeichen von Δ und Γ zusammen sind das arithmetische Kennzeichen einer Hyperbel. Die Lage ihrer Asymptoten und den von ihnen eingeschlossenen Winkel erfahren wir mittels der ersten Differentialquotienten unserer Kurve: $\frac{dy}{dx} = \frac{2x - x^2}{(1-x)^2}$; für $x = +1$ wird er $+\infty$; für Werte zwischen $x = 0$ und $x = +1$ durchläuft er alle Werte von 0 bis $+\infty$; für $x > 1$ bis $x = 2$ durchläuft er alle Werte von $+\infty$ bis 0 und von $x > 2$ bis $x = +\infty$, ebenso von $x = 0$ bis $x = -\infty$ alle Werte von 0 bis -1. Da die Asymptoten die Tangenten unendlich ferner Hyperbelpunkte sind, ergibt sich in unserem Falle, daß die eine Asymptote in $x = +1$ die Abszisse vertikal schneidet; die andere Asymptote schneidet sie in einem nach oben links offenen Winkel von 45°. Der Schnittpunkt beider Asymptoten liegt auf $x = 1$ und $y = -2$, da er symmetrisch liegen muß zwischen den Hyperbelordinaten von geringster Substanz $\frac{dy}{dx} = 0 = \frac{2x - x^2}{(1-x)^2}$; $x_1 = 0$; und $y_1 = 0$ (Minimum der oberen Hyperbel) und $x_2 = +2$; $y_2 = -4$ (Maximum der unteren Hyperbel).

Wie betont, kommt für die Aviditätsberechnung in Frage nur derjenige Teil der oberen Hyperbel mit den Abszissenwerten von 0 bis $+1$. Zu allen Werten von $x > 1$ gehören nur negative y der unteren Hyperbel.

da sie im Baryumsulfatmaß ausgedrückt sind, müssen wir auch die in 20 ccm 0,1 n-HCL enthaltene HCl-Menge, das ist die Einheit, von der x subtrahiert wird, in $BaSO_4$-Maß ausdrücken, diese Einheit wird repräsentiert durch 0,2334 g $BaSO_4$.

Dient als „Bodenkörper“ Baryumchromat, so haben wir für 0,06672 als x-Wert 0,2859 in dem Ausdruck $\frac{x^2}{1-x}$ zu substituieren, so daß $\frac{ch}{c_1} = \frac{0{,}2859^2}{1-0{,}2859}$ $= 0{,}1146 = A_{sc}$ (Avidität der HCl gegen CrO_4Ba). Dient Baryumoxalat als Bodenkörper, so ist für 0,14584 als x zu substituieren: 0,62486, so daß $\frac{ch}{c_1}$ $= \frac{0{,}62486^2}{1-0{,}62486} = 1{,}040 = a_{so}$ (Avidität der HCl gegen Oxalat des Ba).

Da nun innerhalb der bei den Magensaftaciditäten in Betracht kommenden Normalitätsgrade die aufgelösten Barytmengen den Normalitäten proportional sind, so ergibt sich, wie dies bereits Ostwald für viel größere Normalitätsintervalle aus seinen Versuchen abgeleitet hat, das Aviditätsverhältnis von der Konzentration unabhängig.

Niemals beobachtete ich einen Magensaft, der die volle Avidität der reinen Salzsäure besessen hätte, denn die aus den Bodenkörpern aufgelösten Barytmengen waren stets nur ein Bruchteil p (Prozent) von der, welche die in der Normalität korrespondierende Salzsäure aufgelöst hatte. Bei der Chromatmethode berechnet sich daher die Magensaftavidität a_m aus dem Bruchteil p zu $a_{mc} = \frac{0{,}2859^2\, p^2}{1-0{,}2859\,p}$; bei der Oxalatmethode: $a_{mo} = \frac{0{,}62486^2\, p}{1-0{,}62486^2 p}$. Bezieht man jedes a_m auf sein zugehöriges a_s als 100, so erhält man das Aviditätsprozentverhältnis im dritten Stabe obiger Tabelle.

Die etwa eine halbe Stunde nach dem üblichen Ewaldschen Probefrühstück erhaltenen Magensäfte vermochten meist nur 80 bis 98 Proz. derjenigen Barytmenge aufzulösen, welche ihre korrespondierende Salzsäure gelöst hatte. Als Maximum der Avidität wurden 95 Proz. der Salzsäure beobachtet, gewöhnlich betrug sie nur 70 bis 80 Proz. der Salzsäure.

Besondere Vorsicht erheischen diese heterogenen Systeme bezüglich der Temperaturkonstanz, da wenige Temperaturgrade Differenz schon Unterschiede in den aufgelösten Barytmengen herbeiführen, welche die gewöhnlichen Analysenfehler überschreiten. Ich filtrierte daher die flüssige von der festen Phase in einer mit den Schüttelgefäßen in dasselbe Bad versenkten Filtriervorrichtung ab. Da ferner besonders leicht die schleimhaltigen Magensäfte selbst bei der Filtration durch die besten Baryumsulfatfilter noch feinste Partikelchen des Bodenkörpers (am schlimmsten ist $BaCrO_4$) durchtreten lassen, präparierte ich die zu benutzenden Filter am Tage zuvor, indem ich den betreffenden Bodenkörper feinst in Wasser aufgeschlämmt so oft durchfiltrierte, bis die zu weiten Filterporen soweit damit austapeziert waren, daß das Wasser ganz

klar ablief. Nach dem Trocknen über Nacht bei Zimmertemperatur versagten solche präparierten Filter niemals ihren Dienst. Die zu filtrierende Flüssigkeit darf nur für den Moment des Aufgießens aus dem Bade genommen werden, um sogleich wieder darin versenkt zu werden.

Dieser zunächst mehr als Störung empfundene, sehr bedeutende Einfluß der Temperatur stellt sich aber in einem ganz anderen Lichte dar vom Standpunkte van 't Hoffs betrachtet als thermodynamischer Gleichgewichtszustand. Wir können dann die chemische Arbeitsleistung einer Magensalzsäure in Kalorien aus der in Lösung übergeführten Menge chromsauren oder oxalsauren Baryts berechnen, fußend auf der Tatsache, daß dieselbe Säurekonzentration mit steigender Temperatur mehr und mehr von dem Bodenkörper in Lösung bringt. Dieser Vorgang der Auflösung ist aber dem der Verdampfung sehr ähnlich; van 't Hoff[1]) hat 1885 gelehrt, die Clapeyronsche Gleichung, welche die Beziehungen zwischen Temperatur und Volum für die Dämpfe auf Grund des zweiten Hauptsatzes der mechanischen Wärmetheorie mathematisch darstellt, so zu benutzen, daß man die noch unbekannte Verdampfungs-, Sublimations- oder Lösungswärme eines Körpers aus der Vermehrung seines Dampfdruckes oder seiner Löslichkeit mit der absoluten Temperatur berechnen kann. Vergleicht man die Löslichkeitszunahme der in reinem Wasser unlöslichen Baryumsalze beim Erwärmen ihrer mit Säure versetzten Suspensionen mit dem physikalischen Lösungsvorgang, so zeigt sich das Wasser proportional seinem Gehalt an Säure auf Grund der Avidität letzterer befähigt, die Temperatur der Umgebung als „Lösungswärme“ latent zu machen und in chemische Umsetzung zu transformieren, die bei Abkühlung des Systems als „Präzipitationswärme“ wieder zum Vorschein kommt.

Nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik ist der in Arbeit verwandelbare Anteil einer in einem umkehrbaren Kreisprozeß dem System zugeführten Wärmemenge bei den hier in Betracht kommenden kleinen Temperaturunterschieden umgekehrt proportional der absoluten Temperatur, bei der die Arbeit geleistet wird. Wächst in unserer Suspensionsflüssigkeit mit dem Volum V und dem Prozentgehalt P bei der Temperatur T durch Erwärmung um dT der Prozentgehalt um dP, so ist osmotisch die Arbeit $V.dP$ aus der Erwärmung um dT resultiert. Die gesamte, als Lösungswärme q erforderliche Wärmemenge steht nach dem zweiten Hauptsatz zu der erzielten osmotischen Arbeit $V.dP$ in demselben Verhältnis wie die

[1]) Abdruck in Ostwalds Klassikern **110**: J. H. van't Hoff, Die Gesetze des chemischen Gleichgewichts, S. 55 bis 58.

Temperatursteigerung dT zur absoluten Temperatur, bei der sie vorgenommen wurde. d. h. $\frac{V.dP}{q} = \frac{dT}{T}$; aus der kalorischen Form der Gasgleichung: $V.P = 2T$ folgt $V = \frac{2T}{P}$; substituiert man diesen Wert für V, so folgt: $\frac{2T.dP}{P.q} = \frac{dT}{T}$ oder $\frac{dP}{P} = q\frac{dT}{2T^2}$ oder integriert: $lnP = \frac{-q}{2T} + C$.

In dieser Gleichung ist außer dem zu ermittelnden Wert von q ferner unbekannt die Integrationskonstante C. Durch analytische Feststellung der Prozentgehalte P_1 und P_2 unserer Lösung bei zwei verschiedenen Temperaturen T_1 und T_2 bekommen wir zwei Gleichungen:

$$lnP_1 = \frac{-q}{2T_1} + C \text{ und } lnP_2 = \frac{-q}{2T_2} + C;$$

wir eliminieren daraus C, indem wir eine von der anderen subtrahieren und haben

$$q = \frac{lnP_1 - lnP_2}{\frac{1}{2T_2} - \frac{1}{2T_1}} = \frac{2T_1.T_2(lnP_1 - lnP_2)}{T_1 - T_2}.$$

Mit Rücksicht auf die elektrolytische Dissoziation in wässeriger Lösung erscheint die Zahl der Moleküle meist größer, als sie aus dem Molekulargewicht zu berechnen ist, weshalb van't Hoff noch einen für den Dissoziationsgrad der betreffenden Verbindung charakteristischen Faktor i einsetzt, so daß die für q aufgelöste Gleichung lautet: $q = \frac{2i.T_1T_2(ln_1P - lnP_2)}{T_1 - T_2}$.

Der Wert i ergibt sich aus der Gefrierpunktserniedrigung z. B. für n-ClNa = 3,51° statt — 1,85° zu 1,9; geringer wird i schon bei Salzen einwertiger Basen mit zweiwertigen Säuren oder umgekehrt; Natriumsulfat, aus drei Ionen gebildet, zeigt fast dieselbe molekulare Gefrierpunktserniedrigung wie das zweiionige ClNa; noch geringer ist sie bei Salzen zweiwertiger Basen mit zweiwertigen Säuren ($FeSO_4$, $CuSO_4$). Magnesiumsulfat, mit dem wir Baryumchromat und -oxalat, wenn letztere löslich wären, am ehesten vergleichen könnten, erniedrigt nur um — 1,92° statt um — 1,85°. Da Chromsäure und Oxalsäure schwächer als Schwefelsäure sind, dürften ihre Barytsalze dem Normalwert — 1,85 noch näher kommen als Magnesiumsulfat, was bedeutet, daß $i = 1$ sein wird. Da ferner $ln = 2{,}3026.lg$ Brigg ist, wird $q = \frac{4{,}584.T_1.T_2(lgP_1 - lgP_2)}{T_1 - T_2}$. Bei 18° C löste von Baryumchromat 0,1 n-HCl, auf 20 ccm in $BaSO_4$ umgerechnet, 0,06672 und bei 28° 0,0800, bei 18° C löste 0,1 n-HCl von Baryumoxalat die 0,14584 und bei 28° 0,1633 $BaSO_4$ entsprechende Menge. Aus diesen Daten berechnet sich für Baryumchromat $q = 3168$ und für Baryumoxalat $q = 1972$.

Vergleichen wir noch die transformierte Wärmemenge, wenn die 0,1 n-HCl auf $BaCrO_4$ wirkte, mit der aus BaC_2O_4 transformierten. Zu diesem Zwecke drücken wir die $BaSO_4$-Zahlen bei 18° in Prozenten der mit 0,1 n-HCl äquivalenten, das ist 0,2334, aus, so entspricht 0,06672 = 28,59 Proz. und 0,14584 = 62,486 Proz. Demnach beträgt die im Baryumchromatsystem durch Lösung latent gewordene Wärme 905,7 = 3168 . 0,2859 und im Baryumoxalatsystem 1232 = 1972 . 0,62486.

Bei 28° C sind latent im Chromatsystem: 1086 = 3168 . 0,3428; Oxalatsystem: 1379 = 1972 . 0,6997.

Die bei der Neutralisation verschieden starker Säuren mit Basen zu Salzen auftretende Wärmemenge beträgt fast durchgängig etwa 13680 cal. und rührt her von der Vereinigung der Ionen H und OH von Säure und Base zu einem Gramm-Molekül = 18 g Wasser. Da in unserem Chromat- und Oxalatsystem für die zu Chlorbaryum gewordene, also verschwundene Salzsäuremenge x die äquivalente Chromsäure- oder Oxalsäuremenge als Ersatz in die Lösung aufgenommen worden ist, so bleibt der durch Neutralisation aus dem System erhältliche Wärmewert beinahe ungeändert. Der Gehalt einer Flüssigkeit an Säure in Verbindung mit deren Avidität befähigt diese Flüssigkeit also in der Tat, die Wärmeenergie der Umgebung zu chemischer Arbeit, hier Auflösung der wasserunlöslichen Barytsalze, zu transformieren. Dabei ist die Ausgiebigkeit dieser Transformierung genau wie bei der rein physikalischen Auflösung einer der Dissoziation unfähigen Substanz an die Wärmeintensität, das ist die Temperatur der Umgebung, gebunden. Obiger Vergleich zeigte uns ferner, daß bei 18° C vom Baryumoxalatsystem 1232 gegen 906 vom Chromatsystem, also 36 Proz. mehr transformiert wurden, bei 28° C transformierte das Oxalatsystem nur noch 27 Proz. mehr als das Chromatsystem, denn beim Chromatsystem ist beim Übergang von 18° C auf 28° C der zur Transformierung noch disponible Rest Salzsäure ($1 - x = 1 - 0{,}2859 = 0{,}714$) größer als beim Oxalatsystem, wo der Rest $1 - x$ nur noch $1 - 0{,}625 = 0{,}375$ beträgt.

Um die beiden Systeme in einem Bilde aus der Mechanik zu charakterisieren, würde das Chromatsystem einer Federwage oder einem Dynamometer mit kräftiger Feder zu vergleichen sein, im Oxalatsystem benutzen wir dagegen eine Wage mit dehnbarerer, weicherer Feder. Die eingangs erwähnte Messung mittels Wasserstoffgasketten ist eine reine Intensitätsmessung und würde nachgeahmt durch Anlegen eines bereits so weit komprimierten Dynamometers, daß sein Druck den Gegendruck des zu messenden unbekannten Energievorrates gerade kompensierte. Die übliche Titrationsmethode des Magensaftes gegen Kongo und Lackmus ist dagegen eine reine Quantitätsmessung, wobei Kongo die Menge Lauge angibt, bis der H'-Ionengehalt auf $5 \cdot 10^{-5}$ herabgesetzt ist, Lackmus diejenige, bis $H' = 10^{-7}$ erreicht ist. Ich beobachtete regelmäßig, daß Magensäfte mit niedriger Avidität ihrer Säure sich schon durch eine relativ breitere Zone zwischen Kongo- und Lackmusneutralität von den stärker aviden mit schmaler Zone zu erkennen gaben.

Welche Avidität muß eine Magensaftsäure für eine erfolgreiche Pepsinverdauung besitzen? Wären die dabei zu überwindenden chemischen Widerstände so geringfügig wie die Ausfällung des Caseïns aus der in den Magen aufgenommenen Milch, welche schon die schwache Essigsäure bewirkt, so wäre das Wesentlichste an einem Magensaft die Quantität, aber nicht die Avidität seiner Säure. Es handelt sich darum, die Pepsinverdauungsversuche so anzustellen, daß man zwar die Menge der Magensalzsäure unverändert ließ, aber ihre Avidität willkürlich und in berechenbarer Weise abschwächte. Ich benutzte dazu das Glykokoll, welches, wie aus nachher mitzuteilenden Aviditätsmessungen an reiner Salzsäure ersichtlich, die Avidität in spezifischer, meßbarer Weise herunterdrückt.

Zur vergleichenden Messung der Verdauungsgeschwindigkeit in den einzelnen gemäß ihrem Salzsäuregehalt mit $^1/_4$, $^2/_4$, $^3/_4$, $^4/_4$, $1^1/_2$ und 2 Molekülen Glykokoll beschickten Proben desselben Magensaftes wurden je zwei der bekannten Mettschen Eiweißröhrchen in jede eingelegt und nach vierstündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 35° C die wegverdauten Längen der geronnenen Eiweißsäule mit dem Okularmikrometer gemessen und folgende Zahlen ermittelt:

Kongoacidität des Magensaftes = 0,024 n-HCl.

Magensaft	Nach $3^1/_2$ Stunden verdaut	Bemerkungen
1. Ohne Zusatz	15 bis (18) Teilstriche	25 Teilstriche = 1 mm. Die eingeklammerten Zahlen wurden an einem der vier Enden der beiden Röhrchen gemessen; vermutlich war die Eiweißsäule beim Abschneiden des Röhrchens an dem betreffenden Ende in nicht mehr mit bloßem Auge sichtbarer Weise lädiert.
2. + $^1/_4$ Mol. Glykokoll	15 bis (18) „	
3. + $^2/_4$ „ „	15 „	
4. + $^3/_4$ „ „	15 bis (16)	
5. + $^4/_4$ „ „	15 „	
6. + 1,5 „ „	10 bis 12 „	
7. + 2 „ „	8 bis 10 „	

Ein weiterer analoger Versuch ergab ebenfalls noch keine Störung der Verdauungsgeschwindigkeit durch Zusatz von 1 Mol. Glykokoll.

Jedenfalls verträgt die Magensalzsäure eine ganz beträchtliche Einschränkung ihrer Avidität, wenn nur ihre Menge erhalten blieb.

Die Bedeutung der Menge der Magensaftsäure für die Geschwindigkeit der Pepsinverdauung geht sehr deutlich aus folgendem Versuch hervor:

Magensaft mit 0,022 n-HCl Kongoacidität.

Mettsche Röhrchen bei 35° C	nach 4 Stunden	nach 22 Stunden
1. Normal ohne Zusatz	20 Teilstriche	115 Teilstriche
2. halb neutralisiert	7 „	35 „
3. doppelt sauer	20 bis 22 „	125 „

Um in den drei Proben gleichen Fermentgehalt zu behalten, wurden sie vor dem Einlegen der Mettschen Röhrchen von gleichem Ausgangsvolum nach Vornahme der chemischen Prozeduren (Halbneutralisation und Doppeltsauermachen) auf das Doppelte des Ausgangsvolums aufgefüllt. Während die Steigerung der normalen Acidität auf das Doppelte nur eine geringfügige Beschleunigung hervorrief, setzte die Verminderung der normalen Acidität auf die Hälfte die Verdauungsgeschwindigkeit auf nahezu den dritten Teil herunter.

Die beliebte symptomatische Behandlung von hyperaciden Zuständen des Magens durch Einnehmen von doppeltkohlensaurem Natron erscheint daher, sofern man nicht die Stillung von Magenschmerzen oder Hemmung der Sekretion des Magensaftes dadurch bezweckt, im Lichte der obigen Versuchsergebnisse nicht so rationell, weil dadurch gerade das Wertvollere, nämlich die Menge der Magensaftsäure, vermindert wird, während es voraussichtlich genügen würde, die Avidität der Säure auf ein niedrigeres Niveau herabzusetzen, die Menge der Säure im Magensaft aber unvermindert für solche physiologisch-chemische Leistungen wie Caseïnausfällung und Pepsinverdauung zur Verfügung zu behalten. Bei der Abstumpfung der Säure durch Natriumcarbonat würde dagegen die neben dem entstandenen Kochsalz übrig gebliebene Säure, wenn auch ihre Menge vermindert ist, dennoch die ursprüngliche Avidität besitzen.

Zur Aviditätsherabsetzung der Salzsäure wählte ich Glykokoll als die einfachste, den salzsäurebindenden Verdauungsprodukten entsprechende Aminosäure.

Zunächst untersuchte ich bei 18° C, wie das Auflösungsvermögen für Ba-Chromat und -oxalat bei reiner Salzsäure in der Verdünnung von $^1/_{10}$-normal durch den Gehalt von $^1/_4$, $^2/_4$, $^3/_4$ und $^4/_4$ Molekül Glykokoll herabgesetzt wird.

Der Vergleich der beiden Tabellen auf folgender Seite zeigt die bemerkenswerte Tatsache, daß von beiden Bodenkörpern prozentisch zu der von der reinen Salzsäure gelösten Baryummenge die relative Verminderung durch die einzelnen Zusätze fast die gleiche ist (Stäbe 4 von Tabelle 1 und 2). Betrachten wir ferner die von den einzelnen wachsenden Zusätzen hervorgebrachte Gewichtsprozentverminderung, so fällt zumal bei graphischer Darstellung auf, daß sie eine fallende geometrische Reihe bilden.

Nennen wir die von $^1/_4$ Mol. Glykokoll bedingte Abnahme rund 0,8, dann bewirken $^2/_4$ Mol. $0{,}8 . 0{,}8 = 0{,}8^2 = 0{,}64$; ferner $^3/_4$ Mol. $0{,}8^3 = 0{,}512$ und $^4/_4$ Mol. $0{,}8^4 = 0{,}4096$. In diesem konkreten Beispiel ist 0,8 der spezifische Abschwächungseffekt, welchen unsere willkürlich gewählte Einheit $= {^1/_4}$ Mol. Glykokoll hervorruft; nennen wir ihn allgemeiner a, so berechnet sich der Effekt p, hervorgebracht von x Einheiten, zu $a^x = p$ oder $x . lg\,a = lg\,p$.

1. Bodenkörper Baryumchromat. Temperatur: 18° C.

	Zusatz	$BaSO_4$ auf 20 ccm	Gewichts-prozent-verhältnis Prozent	a aus a^x	Avidität in Prozent der HCl ohne Zusatz Prozent
0,1 n-HCl	0	0,06672	100	—	100
„	+ $^1/_4$ Mol. Glykokoll	0,05456	81,77	$= 0{,}8177^1$	62,32
„	+ $^2/_4$ „ „	0,0446	66,84	$= 0{,}8176^2$	39,39
„	+ $^3/_4$ „ „	0,0348	52,16	$= 0{,}8049^3$	22,83
„	+ $^4/_4$ „ „	0,02624	39,33	$= 0{,}7919^4$	12,44

2. Bodenkörper Baryumoxalat. Temperatur: 18° C.

0,1 n-HCl	0	0,14572	100	—	100
„	+ $^1/_4$ Mol. Glykokoll	0,11644	79,9	$= 0{,}799^1$	47,81
„	+ $^2/_4$ „ „	0,09588	65,79	$= 0{,}811^2$	27,58
„	+ $^3/_4$ „ „	0,0724	49,68	$= 0{,}792^3$	13,43
„	+ $^4/_4$ „ „	0,05676	38,95	$= 0{,}790^4$	7,52

Beobachtet man bei irgend einem Zusatz x einen abschwächenden Effekt, so erfährt man den spezifischen Abschwächungseffekt $a = \sqrt[x]{p}$ oder $lg\,a = \frac{1}{x} \cdot lg\,p$. Um ferner zu erkennen, daß die beobachtete Verminderung p_1 auch wirklich Exponentialfunktion von x_1 ist, hat man noch für eine zweite Zusatzmenge x_2 den Wert p_2 zu ermitteln; dann muß sein $a = \sqrt[x_1]{p_1} = \sqrt[x_2]{p_2}$ oder $\frac{lg\,p_1}{x_1} = \frac{lg\,p_2}{x_2}$. Zwecks übersichtlicher graphischer Darstellung des spezifischen Abschwächungseffektes verschiedener Substanzen, wie Glykokoll, Sarkosin, Betaïn, bildete ich zu jedem x und p den Wert $lg\,a$.

Da a als Bruchwert einen Logarithmus mit negativer Kennziffer hat, liegen sämtliche $lg\,a$ wegen des Gleichbleibens dieses Bruches auf einer unterhalb der Abszisse und mit ihr parallelen Geraden. Da eine Gerade durch zwei Punkte festgelegt ist, genügt

zur Erkennung eines der Exponentialfunktion gehorchenden Einflusses die Berechnung von zwei Punkten x_1 und x_2. Je stärker der abschwächende Einfluß, um so tiefer läuft die Parallele für $lg\,a$ unterhalb der Abszisse. So verglich ich z. B. mit dem Glykokoll dessen Methylsubstitutionsprodukte, um zu erfahren, ob, wie bei den Fuchsinen die Methylsubstitution die Farbe oder Lichtabsorption verändert, der spezifische Abschwächungseffekt a auch geändert würde. Als Mittel aus mehreren Versuchen (mit $^2/_4$ und $^4/_4$ Mol. Sarkosin und Betaïn auf 0,1 n-HCl sowohl mit $BaCrO_4$ als auch BaC_2O_4 als Bodenkörper) fand ich, wenn $a = 0{,}8$ Glykokoll angenommen wird, a Sarkosin $= 0{,}82$ und a Betaïn $= 0{,}85$.

Die Abschwächung der „Avidität“ der Säure ist im Magensaft von mehreren durch die Verdauung schon entstandenen Aminosäuren verursacht. Da ein solches Gemenge von Substanzen wenig einladend war, untersuchte ich den Einfluß der Temperatur auf das Säurebindungsvermögen oder den Abschwächungseffekt nur beim Glykokollzusatz von $^4/_4$ Molekül mit Baryumoxalat als Bodenkörper. Die relative Löslichkeitszunahme war bei 28° C gegen 18° C etwas geringer, als wenn kein Glykokoll zugesetzt war. Bei 18° C wurden 0,05676 g $BaSO_4$, berechnet auf 20 ccm 0,1 n-HCl + $^4/_4$ Glykokoll, erhalten, bei 28° C 0,06556 g. Diese vom Glykokoll bedingte Erschwerung der Auflösung des Baryumoxalats ergibt beim Einsetzen dieser Werte in die van't Hoffsche Formel der Lösungswärme $q = 2513$ statt 1972 oder anders ausgedrückt: die Wärme der Umgebung wird bei Gegenwart von Glykokoll weniger gut ausgenutzt als in gleich starker Salzsäure ohne Zusatz.

Am meisten belehrend für das Verhalten der Aminosäuren gegenüber der Salzsäure war die Vergleichung der sechsten Stäbe in den Tabellen 1 und 2 der methodischen Abschwächungsversuche. Die Berechnung der Aviditäten aus $\frac{x^2}{1-x}$ führt nämlich zu dem unhaltbaren Resultat, daß dieselbe mit $^1/_4$ bis $^4/_4$ Mol. Glykokoll versetzte Salzsäure gegenüber dem Baryumchromat eine andere Avidität aufwiese als gegen Baryumoxalat[1]). Wohl aber

[1]) Ein ganz ähnliches Resultat wie bei diesen Versuchen mit steigendem Glykokollgehalt beobachtete ich auch einmal bei einem Magensaft, dessen Menge zu einem Vergleichsversuch mit beiden Bodenkörpern ausreichte; hier betrug nahezu identisch beim Chromatversuch die aufgelöste Baryummenge 90,8 Proz. derjenigen der korrespondierenden Salzsäure, beim Oxalatversuch 91,8 Proz. Aus dem Chromatversuch berechnete sich die Avidität der Magensalzsäure zu 79,52 Proz., aus dem Oxalatversuch zu 74,14 Proz.

wird das ganze Verhalten verständlich, sobald man annimmt, die aufgelösten Baryummengen seien der Ausdruck für die in der Zeiteinheit nicht mit Glykokoll verbunden gewesenen Salzsäuremoleküle; nur diese letzteren seien momentan aktiv, die mit Glykokoll verbundenen aber temporär inaktiv. Deshalb haben wir auch in dem Ausdruck $\frac{x^2}{1-x}$ die Zahl 1 im Nenner nicht mehr als 1 anzusetzen, sondern dafür 0,8, so daß der Aviditätsausdruck lauten würde: $\frac{0{,}8^2 . x^2}{0{,}8 - 0{,}8x} = \frac{0{,}8x^2}{1-x}$; nach der Anmerkung 1) auf S. 290 ist aber die in den Lehrbüchern als Konstante h oder „Löslichkeit" des Bodenkörpers eingeführte Größe in Wirklichkeit nicht konstant, sondern ist, da sie den in Lösung befindlichen Mengen der Bodenkörperbestandteile proportional ist, auch mit dem nämlichen Koeffizienten wie seine Konzentration in der Lösung zu versehen. Dann lautete für $^1/_4$ Mol. Glykokollzusatz die Gleichung für die Avidität $\frac{c . 0{,}8h}{c_1}$ $= \frac{0{,}8^2 x^2}{0{,}8 - 0{,}8x}$, mit anderen Worten, die Avidität der vom Glykokoll nicht gebundenen Salzsäuremoleküle hat keine Änderung erfahren.

Als weitere Stütze für diese Auslegung der methodischen Versuche in Tabelle 1 und 2 führe ich folgende Messungen der elektrischen Leitfähigkeiten von 0,1 n-HCl an, die mit $^1/_4$, $^2/_4$, $^3/_4$, $^4/_4$ Mol. Glykokoll versetzt war. Das eigentlich zersetzend oder lösend auf den Bodenkörper Einwirkende sind die Ionen der Salzsäure; durch successiven Glykokollzusatz werden mehr und mehr Moleküle der Salzsäure gebunden und temporär inaktiv. Die inaktiv gewordenen vermindern die Leitfähigkeit der Lösung für Elektrizität, und es war mir interessant zu konstatieren, daß die Leitfähigkeitsabnahme als Funktion des Glykokollgehaltes sich in demselben Exponentialgesetz und sogar mit annähernd demselben Bruchwert darstellt, der die Auflösung der Bodenkörper charakterisierte. Vergleichende Versuche bei 18° C und 28° C in einem Kohlrauschschen Widerstandsgefäß gaben bei einer bestimmten Einstellung der Elektroden die Werte der nebenstehenden Tabelle.

Die Geschmacksnerven der Zunge gestatten, wenigstens Nichtrauchern, sehr deutlich den verschiedenen Ionengehalt dieser Lösungen zu unterscheiden.

Dieser Parallelismus zwischen der die Leitfähigkeitsverminderung bedingenden Ionenabnahme und der verminderten Zersetzungswirkung der Salzsäure auf die „Bodenkörper" infolge steigender

	Glykokoll-Zusatz Molekül	Widerstand bei 18° C Ohm	Strommenge	a aus a^x	Widerstand bei 28° C Ohm	Strommenge	a aus a^x
0,1 n-HCl	0	270	100	—	244	100	—
„	1/4	346	78	0,78	297	82,1	0,821
„	2/4	440	61,4	0,7833	374	65,24	0,8077
„	3/4	577	46,8	0,7764	487	50,1	0,7942
„	4/4	750	36	0,7746	625	39,04	0,7904

Glykokollzusätze modifiziert die anfänglich vermutete Aviditätsabnahme der Säure des Magensaftes dahin, daß die einzelnen Eiweißverdauungsprodukte ebenso wie das Glykokoll oder Betaïn ein spezifisches Bindungsvermögen auf die freie Salzsäure ausüben und dabei einen bestimmten Bruchteil derselben temporär in den nicht ionisierten Zustand versetzen, aber ihn nicht dauernd inaktivieren, wie bei der partiellen Neutralisation mit einer richtigen Base. Die frei oder dissoziiert gebliebenen Salzsäuremoleküle, die wir mit dem Bruchwert a bezeichnen, werden beim Passieren einer zweiten Lage HCl-bindender Moleküle abermals auf den gleichen Bruchteil eingeschränkt, da statt 1 aber nur a in die Schicht 2 eintraten, kommen bloß $a \cdot a = a^2$ heraus in eine eventuelle dritte, nach deren Passieren nur noch a^3 übrig sind.

Zerlegen wir uns allgemeiner die beliebige Konzentration x Glykokoll in x Einheitsschichten, die hintereinander in der Flüssigkeit aufgestellt sein sollen, bis die durchgekommenen HCl-Moleküle (p Prozent) auf den Bodenkörper treffen, so haben wir die vollste Analogie mit der Absorption des Lichtes durch verschieden konzentrierte Farbstofflösungen; das daraus in unser Auge treffende Licht ist der Rest der dem gleichen Exponentialgesetz der Absorption unterlegenen eintretenden Lichtmenge. Wüßten wir nichts von den Ionen der Salzsäure als Ursache der elektrischen Leitfähigkeit und der Zersetzung der Bodenkörper, so würden wir Glykokoll usw. als ähnliche Absorbentien elektrischer und chemischer Energie bezeichnen, wie es die Farbstoffe für das Licht sind, wobei allerdings auffallend bliebe, daß diese Absorption im Gegensatz zu der des Lichtes so sehr von der Temperatur beeinflußt werde.

XVI.

Beobachtungen über Bildung von Säure und Alkali in künstlichen Nährsubstraten von Schimmelpilzen.

Von **Eduard Kohn** und **Friedrich Czapek** (Ref.).

Bei dem weiten und allgemeinen Interesse, welches die vitale Bildung von Säure und Alkali für den Biochemiker besitzt, mögen in dieser Zeitschrift die nachfolgenden Ausführungen, die sich an meine Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung durch Schimmelpilze [1]) anschließen, Raum und Beachtung finden.

An verschiedenen Stellen der erwähnten Arbeit werden Ergebnisse angeführt, welche mit den Resultaten in Versuchen anderer Autoren im Widerspruch zu stehen scheinen. So wurde gefunden, daß Aspergillus niger van Tiegh., der von mir untersuchte Schimmelpilz, auf einer Nährlösung, bestehend aus 100 ccm Wasser, 3 g Rohrzucker, 1 g Chlorammonium, 0,05 g $MgSO_4$, 0,1 g KH_2PO_4, 0,05 g KCl und 0,001 g $FeSO_4$ nicht zu gedeihen vermag, während seitens anderer Forscher in zahlreichen früheren Arbeiten mit Chlorammonium bei Schimmelpilzen gute Nährerfolge erzielt worden waren. In anderen Versuchsreihen stellte es sich heraus, daß Aspergillus niger in einer Nährlösung, welche 1 Proz. Ammoniumacetat als Stickstoffquelle führte, im übrigen aber die eben erwähnte Zusammensetzung hatte, gleichfalls kein Wachstum aufwies. Und doch hatte unter anderen Molisch [2]) Aspergillus niger sowie Penicillium glaucum auf einer Nährlösung, welche essigsaures Ammonium als einzige Stickstoff- und Kohlenstoffverbindung enthielt, zu gutem Gedeihen gebracht. Außer diesen Fällen waren es noch einige andere, welche mich bewogen, ausführliche Nachforschungen über die Ursache solcher Differenzen anzustellen.

[1]) F. Czapek, Diese Beiträge 1, 538; 2, 557; 3, 47 (1902).

[2]) H. Molisch, Sitzungsber. Wien. Akad., math.-nat. Kl. 103, Abt. I, 562, Oktober 1894.

Während dieser Arbeiten erschien eine unser Thema sehr nahe berührende Untersuchung von J. Nikitinsky [1]) aus dem Leipziger botanischen Institute, welche im wesentlichen jene Auffassungen über die Wirkung von Ammoniumchlorid brachte, zu denen auch ich selbständig gekommen war. Ich hatte mittlerweile die einschlägigen experimentellen Studien Herrn E. Kohn, Assistenten meines Laboratoriums, übertragen, welcher sie unter meiner Leitung zu einem vorläufigen Abschluß brachte. Trotzdem ein Teil unserer Ergebnisse nach der Arbeit Nikitinskys nicht mehr neu erscheint, haben wir dennoch nicht von unserer Publikation abgesehen, da wir über einiges Tatsachenmaterial verfügen, welches Nikitinsky nicht zu Gebote stand, und auch unsere Fragestellungen zum Teil wesentlich andere waren. Den Berührungspunkt unserer beiderseitigen Untersuchungen bildet die Nährwirkung von Ammoniumchlorid, mit deren Betrachtung wir hier unsere Erörterungen eröffnen wollen.

1. Versuche mit Ammoniumchlorid.

Nikitinsky hat gezeigt, daß Aspergillus niger in einer Nährlösung, enthaltend 4 und mehr Proz. Zucker, 1 Proz. Chlorammonium, 0,5 Proz. KH_2PO_4, 0,25 Proz. $MgSO_4$, 0,05 Proz. KCl und 2 Tropfen pro 100 ccm von 5proz. $FeCl_3$-Lösung, anfangs Wachstum zeigt; die vom Pilzrasen abfiltrierte Nährlösung bleibt auch noch mehrmals für neue Einsaat tauglich. Sie hört aber lange vor Erschöpfung auf, tauglich zu sein, und zwar deswegen, weil ihre Acidität stark zunimmt. Hält man die Lösung bei dauernd neutraler Reaktion, so kann man darin eine sehr große Zahl von Kulturen successive zur Entwickelung bringen.

Wir haben in der Tat, unabhängig von Nikitinsky, die Überzeugung gewonnen, daß eine Ammoniumchlorid enthaltende Nährlösung nur dann für das Fortkommen von Aspergillus tauglich ist, wenn sich ihre Reaktion von der neutralen nicht zu sehr entfernt. Schon in meiner ersten Arbeit [2]) hatte ich mich dahin geäußert, daß das Ausbleiben des Schimmelpilzwachstums auf NH_4Cl-haltigen Nährlösungen durch sekundäre Säurewirkung zu erklären sei. Wenn ich jedoch von einer „schädlichen Ansammlung der nicht resorbierten Chlorionen“ sprach, so beruht dies auf einer teilweise mißverständlichen Auffassung, wie Nikitinsky (l. c.) mit Recht bemerkt hat. Die in Rede stehende Erscheinung gehört in das Gebiet der Er-

[1]) J. Nikitinsky, Jahrbüch. f. wiss. Botan. 40, 1 (1904).

[2]) Diese Beiträge 2, 581.

scheinungen an Lösungen von Salzen schwacher Basen mit starken Säuren. In einer wässerigen Chlorammoniumlösung werden unter Beteiligung der Ionen des Wassers Molekel von Ammoniumhydroxyd rückgebildet, wodurch andererseits freie Wasserstoffionen entstehen. Der Prozeß wird durch Entnahme von Ammoniak seitens des Pilzes gefördert, indem dann neue NH_4-Ionen entstehen müssen, die neuerlich zur NH_4OH-Bildung verwendet werden, wodurch wieder freie Wasserstoffionen entstehen.

Wie ich in meinen früheren Arbeiten darlegte, ist diese Wachstumshemmung durch sekundäre Säurewirkung bei NH_4Cl am stärksten, schwächer bei $(NH_4)_2SO_4$, noch schwächer bei Ammonphosphat. In der Tat ist dies theoretisch zu erwarten, da die Erscheinung um so mehr hervortreten muß, je stärker die an das Ammonium gebundene Säure ist.

Nikitinsky glaubt, daß meine Beobachtungen über Ausbleiben der Pilzentwickelung auf NH_4Cl-haltigen Nährlösungen nicht richtig seien, wie dies aus den zahlreichen Literaturangaben ganz deutlich hervorgehe (z. B. Wehmer, Botan. Ztg. 1891, S. 340 und 471 [Tab. C]; Butkewitsch, Jahrbüch. f. wissensch. Botan. **38**, 211 [1902]), und auch er habe immer unter ganz ähnlichen Bedingungen ein gutes Wachstum bei NH_4Cl als N-Quelle beobachten können.

Die Wiederholung meiner Versuche zeigte jedoch, daß die früheren Beobachtungen vollständig richtig waren und daß die Nährlösung der oben angegebenen Zusammensetzung das Wachstum von Aspergillus und Penicillium nicht gestattet. Dies beruht aber nur auf der starken Acidität dieser Lösung, wie ich schon früher vermutet hatte.

Wir stellten je drei gleiche Kulturversuche mit meiner chlorammoniumhaltigen Nährlösung auf; eine ließen wir bei ihrer schwach sauren Reaktion, die zweite wurde mit Ammoniak genau neutralisiert, die dritte damit schwach alkalisch gemacht. Eine Serie von drei Kulturkölbchen wurde mit Aspergillus niger, die andere mit Penicillium glaucum geimpft. Aspergillus kam bloß in der neutralen Lösung zu gutem Gedeihen und zeigte in der schwach sauren Lösung nur ein minimales Wachstum. Penicillium hingegen kam in beiden Lösungen zu guter Entwickelung. In der alkalischen Lösung wuchsen beide Schimmelpilze nicht. Nach Verlauf von einigen Tagen kam das Penicillium in der schwach sauren Lösung zum Stillstand, etwas später stockte auch das Wachstum von Aspergillus und Penicillium in den neutralisierten Lösungen. Wir überzeugten uns zu diesem Zeitpunkte, daß die Reaktion der Lösungen deutlich sauer geworden war.

Als wir neuerdings neutralisiert hatten, wurde das Pilzwachstum überall wieder aufgenommen. Das Neutralisieren wurde unter strengem Vermeiden einer Infektion vorgenommen, indem 5 ccm der Lösung mittels steriler

Pipette entnommen und deren Acidität genau ermittelt wurde. Da das Flüssigkeitsvolum der Kultur genau bekannt war, konnte sofort das nötige Quantum sterilen Alkalis aus steriler Pipette der Kultur zugefügt werden.

Penicillium glaucum war in unseren Versuchen stets resistenter gegen Säure als Aspergillus niger. Nikitinsky fand das Gegenteil, woraus man schließen müßte, daß nicht alle Stämme dieser Schimmelpilze die gleiche Resistenz gegen die Einwirkung von Wasserstoffionen besitzen und Nikitinskys Schlußfolgerung kann nicht allgemein gelten. Gegen Hydroxylionen sind beiderlei Pilze viel weniger widerstandsfähig als gegen Wasserstoffionen.

Unsere Versuche bestätigen andererseits vollständig die Ergebnisse von Nikitinsky, daß in chlorammoniumhaltigen Nährlösungen durch ungleich starke Konsumption der Ionen des Ammonsalzes eine stark saure Reaktion der Nährlösung eintritt. Wir haben es mit einem einfachen und lehrreichen Falle von vitaler Säurebildung im Nährsubstrate durch das „Wahlvermögen“ des Pilzes zu tun.

2. Versuche mit Ammoniumbromid, -jodid und -fluorid; ferner mit chlorsaurem und jodsaurem Ammoniak.

Es erscheint mithin evident, daß bei der Schädigung des Pilzwachstums durch Chlorammoniumgehalt der Nährlösung eine sekundäre Wirkung: die Aciditätssteigerung der Lösung, die Hauptrolle spielt, und nicht eine direkte toxische Wirkung der Chlorionen. Diese Erfahrung läßt sich nun nicht direkt auf die Schädigung durch Ammoniumbromid und Ammoniumjodid übertragen.

Wir wissen schon längere Zeit durch Versuche von O. Loew [1]), daß Hefen und Schimmelpilze durch Kaliumjodid nicht sehr erheblich leiden, weniger als Phanerogamen; Kaliumbromid fand Loew etwas schädlicher und die Fluoride sind relativ recht giftige Stoffe. Die Erfahrung, daß Jodide auf Aspergillus wenig toxische Wirkung entfalten, hat erst in neuester Zeit Raciborski [2]) wiederum bestätigt.

Nach unseren Erfahrungen hat man bei Darreichung von Ammoniumbromid, Jodid und Fluorid und bei der Beurteilung der etwa auftretenden Hemmungseffekte auf das Pilzwachstum wohl zu unterscheiden zwischen der schon vom Ammoniumchlorid beschriebenen sekundären Säurewirkung und der direkten Schädigung durch die Halogenionen.

---

[1]) O. Loew, Natürliches System der Giftwirkungen (1887).

[2]) M. Raciborski, Chemomorphosen des Aspergillus niger, Bull. Acad. Scienc. de Cracovie, S. 775, Krakau 1906.

Auf einer Nährlösung, welche statt 1 Proz. Ammoniumchlorid die gleiche Menge Ammoniumbromid enthielt, wuchs unter den gebotenen Bedingungen wohl Penicillium, nicht jedoch Aspergillus niger. Das gleiche Verhältnis war zu konstatieren bei Anwendung von Ammoniumjodid. Das Penicillium wuchs hierbei unter Bildung runder konidienloser weißer Räschen und produzierte Gelbfärbung der Nährlösung. Diese Lösungen reagierten sauer. Als dieselben neutralisiert worden waren, zeigte auch Aspergillus niger auf beiden Substraten eine schwache Entwickelung. Bei Ammoniumfluorid vermochte ohne Neutralisation der Nährlösung weder Penicillium noch Aspergillus zu einem schwachen Wachstum zu gelangen. In der neutralisierten Fluoridnährlösung zeigten Penicillium und Aspergillus jedoch ein kümmerliches Gedeihen.

Augenscheinlich spielt demnach in allen diesen Fällen die saure Reaktion der Nährlösung eine wichtige Rolle beim Zustandekommen der Giftwirkung, und man kann, wie es beim Chlorammonium gezeigt wurde, auch die Hemmung durch NH_4J, NH_4Br und NH_4Fl zum Teil durch Neutralhalten der Nährlösung eliminieren. Ein normales Gedeihen zeigen aber die Schimmelpilze selbst bei strenger Neutralität dieser Nährsubstrate nicht, so daß unbedingt eine direkte Schädigung durch die Ionen Br, J und Fl anzunehmen ist. Br und J dürften sich unseren Beobachtungen zufolge nicht beträchtlich hinsichtlich ihrer Intensität der toxischen Wirkung entfernen; Fl übertrifft sie ebenso bedeutend, wie für Cl eine direkte Toxicität nicht leicht nachzuweisen ist.

Weitere Versuche betrafen die Wirkung von Ammoniumchlorat und Ammoniumjodat.

Chlorsaures Ammonium in 1proz. Lösung stellten wir uns dar durch Fällung der berechneten Menge gelösten Baryumchlorates mit Ammoniumsulfat. Sodann wurde vom $BaSO_4$ abfiltriert und der Lösung 3 Proz. Zucker sowie die nötigen Mineralsalze in der sonst angewendeten Konzentration zugefügt. Die Sterilisierung geschah mittels Pukallscher Tonfilter. Die Reaktion der Lösung war sauer. Weder Penicillium noch Aspergillus zeigten hierin Wachstum. Nach genauer Neutralisation der Lösung gingen die eingeimpften Pilzkonidien auf, und auch hier bildete Penicillium zahlreiche runde, weiße, konidienlose Räschen unter Abscheidung eines wasserlöslichen, gelben Pigmentes in das Substrat. Aspergillus wuchs weniger stark als Penicillium.

Ganz analoge Resultate ergaben sich für das jodsaure Ammon. Auch dieses Präparat war aus dem reinsten Barytsalze des Handels dargestellt worden.

Die komplexen chlor- und jodhaltigen Anionen ClO_3 und JO_3 sind mithin wohl nicht ganz von direkter Giftwirkung auf die Schimmelpilze freizusprechen und rangieren etwa in die gleiche Linie wie das ionisierte Jod und Brom. Jedenfalls ist Cl viel ungiftiger als ClO_3. Aber auch hier spielt die sekundäre Säure-

bildung durch Nichtverarbeitung der Anionen der Ammoniumsalze eine gewichtige Rolle und es ist zur Erhaltung des Pilzwachstums stete Neutralhaltung der sich ansäuernden Nährlösung unbedingt erforderlich.

Wie notwendig es ist, daß man sich bei der Untersuchung des Nährwertes von chemischen Verbindungen stets die Möglichkeit vor Augen hält, daß das Pilzwachstum nur durch steigende Acidität des Substrates unterdrückt werden kann, braucht nicht erst dargelegt zu werden. So wachsen Schimmelpilze in 1proz. Lösung von Acetamid (+ 3 Proz. Zucker), welche neutral reagiert, sehr gut. Sie gedeihen jedoch nicht[1]), wenn man das Acetamid durch Methyldiacetamid:

$$\begin{matrix} CH_3 . CO \\ CH_3 . CO \end{matrix} > N . CH_3$$

ersetzt. Diese Nährlösung reagiert aber sauer. Neutralisiert man mit Ammoniak, so läßt sich darauf Pilzwachstum erzielen und es wird das Methyldiacetamid verbraucht.

3. Sekundäre Alkaleszenzwirkungen.

So wie durch Konsumption der Kationen eines Salzes und Rückbleiben der Anionen eine sekundäre Säurebildung und Säurewirkung auf den konsumierenden Organismus zustande kommen kann, so kann auch eine vitale Alkalibildung im Substrate durch vorherrschenden Verbrauch der Anionen eines vorhandenen Salzes entstehen.

Ein bereits gut gekanntes Beispiel solcher Vorkommnisse ist die Alkalibildung bei der Nitratgärung durch denitrifizierende Mikroben. Diese Bakterien verarbeiten aus dem dargereichten KNO_3 die Anionen NO_3 unter quantitativer Abscheidung des Stickstoffs als Stickstoffgas. Die K^+-Ionen bleiben zurück, wodurch eine Alkaleszenz hervorgerufen wird, welche dem Bakterienwachstum nach Burri und Stutzer[2]) erst eine Grenze setzt, wenn sie etwa 1 Proz. Na_2CO_3 entspricht. Nach Nikitinsky[3]) findet in der kalisalpeterhaltigen Kulturflüssigkeit von Aspergillus und Penicillium keine Anhäufung von Alkali statt. Die Pilze verarbeiten also offenbar auch die K-Ionen intensiv, ebenso wie die NO_3-Ionen. Doch vermochte Nikitinsky[4]) bei der Darreichung von Kalium-

---

[1]) Vgl. Czapek, Diese Beiträge 2, 570 (1902).
[2]) R. Burri und A. Stutzer, Centralbl. f. Bakter., II. Abt., 1, 422 (1895).
[3]) l. c. S. 22.
[4]) l. c. S. 27.

tartrat an die erwähnten Schimmelpilze, und besonders bei Penicillium glaucum ein rasches Alkalischwerden des Kulturmediums zu konstatieren, nachdem schon vor längerer Zeit Wehmer[1]) die alkalische Reaktion einer von Aspergillus niger bewachsenen Ammoniumtartratlösung und die Bildung von Ammoniumcarbonat unter diesen Verhältnissen entdeckt hatte. Nach Nikitinsky ist bei Kaliumtartratdarreichung das Rückbleiben der Kaliumionen die Ursache der stark ansteigenden Alkaleszenz der Nährflüssigkeit.

An diese interessante zuerst von Wehmer aufgefundene Tatsache vermögen wir nun einige verwandte Fälle anzureihen.

Wie erwähnt, konnte von uns unter Einhaltung der eingangs erwähnten Zusammensetzung der Nährlösung keine nennenswerte Verarbeitung von Ammoniumacetat durch unsere Schimmelpilze beobachtet werden. Hingegen war es verschiedenen anderen Forschern gelungen, Penicillium sowohl wie Aspergillus auf Ammoniumacetatnährlösung zu guter Entwickelung zu bringen. Die Wiederholung meiner früheren Versuche durch meinen jetzigen Mitarbeiter führte wiederum zu negativem Resultate. Ebenso wie essigsaures Ammon verhielt sich Ammoniumpropionat und -butyrat.

Nun reagiert eine Lösung von 3 Proz. Kaliumacetat (Kohlenstoffquelle) und 1 Proz. Ammoniumphosphat (Stickstoffquelle) alkalisch, und es läßt sich leicht zeigen, daß die Lösung zur Ernährung der Schimmelpilze tauglich wird, wenn man sie schwach ansäuert und dauernd bei schwach saurer oder auch neutraler Reaktion hält. Der Pilz macht nämlich die Lösung immerfort aufs neue mehr alkalisch. Ganz analog ist es bei der Darreichung von Ammoniumacetat als Stickstoffquelle neben Zucker als Kohlenstoffquelle. Die Lösung muß von Anfang an angesäuert werden, da eine reine Lösung von $CH_3.COONH_4$ alkalisch reagiert. Der Pilz verbraucht offenbar zunächst die geringe Menge von NH_4-Ionen, welche dieses sehr schwach dissoziierte Salz liefert. Es bleibt eine entsprechende kleine Menge von $CH_3.COO$-Ionen zurück. Bei der geringen Konzentration an solchen Ionen kommen bereits die Ionen des Wassers in Betracht, und es wird eine kleine Menge von Essigsäuremolekeln neben freien OH-Ionen gebildet. Darin besteht der neue Gleichgewichtszustand. Die Verarbeitung der NH_4-Ionen durch den Pilz hält demnach die Alkaleszenz in steigender Linie aufrecht. Der Endeffekt ist aber auch bei der Darreichung von Kaliumacetat der gleiche, woraus die Pilze die Essigsäure verarbeiten. Gegen

[1]) C. Wehmer, Bericht. Deutsch. bot. Ges. 9, 172 (1891).

die auftretende alkalische Reaktion waren sämtliche Schimmelpilze viel empfindlicher als gegen supramaximale Acidität der Nährlösung.

In unseren jetzigen Versuchen wurde zunächst eine Lösung hergestellt, welche 3 Proz. $KOOC.CH_3$ und 1 Proz. Ammoniumphosphat enthielt; sie reagierte gegen Lackmus schwach alkalisch (I). Als zweite Lösung diente dieselbe Zusammensetzung, aber vollkommen scharf mit Essigsäure gegen Lackmus neutralisiert (II). Einer dritten Lösung wurde bei derselben Zusammensetzung ein kleiner Überschuß an Essigsäure zugegeben. Alle drei Lösungen wurden durch Pukallfilter in sterile Erlenmeyerkölbchen filtriert und mit Aspergillus niger geimpft. Bei einer Temperatur von 29° C im Brutschrank waren nach 8 Tagen an der Oberfläche der neutralen Lösung II schöne konidienreiche Pilzrasen gebildet. Die Lösungen I und III waren noch nach drei Wochen rein. Nun neutralisierten wir diese beiden Proben mit Essigsäure bzw. Kalilauge genau. Dies geschah in der oben erwähnten Weise nach vorheriger tritrimetrischer Ermittelung der nötigen Säure- oder Alkalimenge durch Zusatz der letzteren im Impfkasten mittels steriler Pipette. Die genaue Neutralisation erfolgte durch eine Tüpfelprobe, indem ein ausgeglühter Glasstab nach dem Erkalten in die Flüssigkeit getaucht wurde und die entnommenen Tropfen gegen Lackmuslösungtropfen auf einer Porzellanplatte geprüft wurden.

In der Nährflüssigkeit II hörte das Pilzwachstum bald auf; die Prüfung der Reaktion ergab, daß die Lösung alkalisch geworden war. Nach Neutralisation trat neuerdings Wachstum ein. In den Nährlösungen I und III hatte die Neutralisation denselben Effekt. Immer aber stellte sich im Laufe der Zeit wieder alkalische Reaktion und Wachstumshemmung ein.

Penicillium unterschied sich insofern von Aspergillus, als es auch in der schwach sauren Lösung III noch fortkam. Doch bildete es keine Konidien. In der schwach alkalischen Lösung I war Neutralisation unbedingt nötig, um auch das Penicillium zu Wachstum zu veranlassen.

Als wir statt Kaliumacetat Ammoniumacetat für eine Wiederholung dieser Versuche anwendeten, wuchs Aspergillus niger schon in der ursprünglichen schwach alkalischen Lösung ein wenig, Penicillium sogar recht gut. Nach Neutralisation der Lösung mit einem Tropfen Essigsäure wurde das Pilzwachstum sehr deutlich gesteigert und war üppiger als auf Kaliumacetat.

Dies zeigt, daß bei den Kaliumacetatversuchen wahrscheinlich die ansteigende Alkaleszenz auf dem Umstande beruht, daß die Säureanionen schneller verarbeitet werden als die Kaliumionen. Bei den Ammoniumacetatversuchen hingegen werden wir im Sinne der oben gegebenen Erklärung eher einen Mehrverbrauch von NH_4-Ionen anzunehmen haben und die steigende Alkaleszenz auf „Hydrolyse“, d. h. auf freie OH-Ionen des Wassers zurückführen.

Damit stimmt auch überein, daß die Alkalianhäufung bei den Ammoniumacetatversuchen eine viel geringere ist, als bei den Kaliumacetatversuchen.

Im Einklange mit unseren Auffassungen steht ferner die experimentelle Erfahrung, daß eine Kaliumacetatlösung mit einer Chlorammoniumlösung gemischt eine gute Nährlösung darstellt, wenn auch die beiden Lösungen für sich allein kein Pilzwachstum unterhalten. Dieser Mischungsvorgang stellt tatsächlich eine Neutralisation dar.

Auf Ammoniumpropionat konnte ein ähnlicher Effekt der Neutralisation sichergestellt werden. Doch war das Pilzwachstum im Vergleich zu den Acetatversuchen auch dann nur kümmerlich.

Eine weitere einschlägige Erscheinung bildet die Ernährung von Schimmelpilzen durch Alkylamine. Die Alkylamine sind starke Basen. Die wässerigen Lösungen ihrer Salze mit schwachen Säuren, z. B. Methylaminacetat, reagieren schwach alkalisch, aus demselben Grunde, weshalb wässerige Cyankaliumlösung alkalisch reagiert. Jene Salze sind wenig dissoziiert; die Anionen liefern mit den Wasserstoffionen des Lösungsmittels Säuremolekel, während die Hydroxylionen durch die Alkalireagenzien nachweisbar werden. Wenn ein Pilz z. B. Methylaminacetat neben Zucker als Stickstoffquelle dargereicht erhält, so verarbeitet er vor allem die Kationen des schwach dissoziierten Aminsalzes, und es entstehen wie bei Verarbeitung von Ammoniumacetat dauernd Essigsäuremolekel und etwas freie Hydroxylionen. Es ist demnach verständlich, warum auf Methylaminacetatzuckernährlösung die Alkaleszenz sehr bald solche Grade durch den Stoffwechsel des Pilzes erreicht, daß das Wachstum des Pilzes eingestellt wird.

Eine Lösung von 3 Proz. Traubenzucker und 1 Proz. essigsaurem Methylamin reagiert von vornherein schwach alkalisch gegen Lackmus. Ein Wachstum von Aspergillus niger erfolgt darauf nicht, wie schon frühere Versuche ergaben[1]). Neutralisiert man die Lösung mit Essigsäure, so kann man aber sowohl Aspergillus wie Penicillium darauf zum Wachstum bringen. Nur muß die Lösung wie in den früheren Versuchen stets bei neutraler Reaktion erhalten werden, da der Pilz dauernde Anreicherung an Alkali darin erzeugt.

Die Chlorhydrate der Alkylamine hingegen sind fast allgemein sehr geeignet als Pilznährstoffe. Ihre Lösungen reagieren schwach sauer; hier überwiegt die Wirkung der Wasserstoffionen, indem Kationen der Base mit Hydroxylionen des Wassers Aminmolekel liefern und die Lösung hierdurch freie H-Ionen enthält. Je schwächer

[1]) Czapek, Diese Beiträge 2, 560 (1902).

die salzsaure Aminbase dissoziiert ist, desto stärker saure Reaktion weist ihre Lösung auf, und damit hängt es zusammen, daß in einer Nährlösung mit Triäthylaminchlorhydrat Pilzwachstum nur nach vorheriger Abstumpfung der sauren Reaktion erfolgen kann. Dann aber wachsen darin sowohl Penicillium als Aspergillus auch ohne Zuckerzusatz.

4. Grenzen der von den Schimmelpilzen ertragenen Acidität und Alkaleszenz.

In den oben erwähnten Versuchen mit Kaliumacetat und Ammoniumchlorid wurde durch Titration die Alkalinität bzw. Acidität nach erfolgter Einstellung des Pilzwachstums bestimmt. Die Nährlösungen wurden von der Pilzdecke abfiltriert, die Pilzdecke auf dem Filter gewaschen und die vereinigten Flüssigkeiten auf das Volum von 100 ccm gebracht. Hierauf wurde mit n/10-KOH bzw. n/10-Essigsäure titriert.

Nach dreiwöchentlicher Kultur war bei Aspergillus niger in Kaliumacetat der Alkaligehalt gestiegen von 0,2 ccm n/10-KOH bis auf 0,9 ccm n/10-KOH oder von 0,001 Proz. KOH auf 0,005 Proz.

In den entsprechenden Versuchen an Penicillium war die Alkaleszenz von 0,2 ccm auf 0,7 ccm n/10-KOH gestiegen, oder von 0,001 Proz. auf 0,004 Proz. KOH.

Wir bestimmten nun, ob diese gefundenen Alkalimengen wirklich den kritischen Konzentrationswert für KOH darstellen. Die Kaliumacetatlösung wurde genau neutralisiert (mit Phenolphthaleïn als Indikator) und sodann eine Reihe von Kölbchen mit steigenden Mengen von n/10-KOH versetzt, nachdem sie mit Schimmelpilzkonidien beimpft waren. Es genügte für beide Pilze ein Zusatz von 0,7 ccm n/10-KOH, um das Wachstum zu hemmen, was mit obigen Erfahrungen übereinstimmt.

Die schädliche Wirkung von Säure (Wasserstoffionen) äußerte sich erst bei viel höheren Gaben. Selbstverständlich wirken die stark dissoziierten Mineralsäuren schon in kleineren Zusätzen als die schwach dissoziierten organischen Säuren. Unser Penicillium glaucum war in allen Fällen gegen Säure resistenter als unser Stamm von Aspergillus niger.

In den Nährlösungen mit Chlorammonium als Stickstoffquelle stieg der ursprüngliche Gehalt an Säure von 1,7 ccm Normal-HCl oder 0,06 Proz. bei Aspergillus niger nach dreiwöchentlicher Kultur auf 12,5 ccm Normal-HCl oder 0,45 Proz.; bei Penicillium auf 13,2 ccm Normal-HCl oder 0,48 Proz.

In den folgenden Versuchen setzten wir der genau neutralisierten ammoniumchloridhaltigen Nährlösung nach deren Verteilung in Kölbchen zu je 100 ccm steigende Mengen von Normal-HCl, Normal-H_2SO_4 und Normalessigsäure zu. Die Kölbchen wurden sterilisiert, mit Aspergillus- und Penicilliumkonidien geimpft und nun aufgestellt, um die wachstumshemmende Säuremenge zu bestimmen.

Für Normalsalzsäure fanden wir als Grenzwerte:

10,5 ccm oder 0,38 Proz. für Aspergillus,
18,1 ccm oder 0,66 Proz. für Penicillium.

Für Normalschwefelsäure:

17,0 ccm oder 0,83 Proz. für Aspergillus,
18,0 ccm oder 0,88 Proz. für Penicillium.

Für Normalessigsäure:

21,0 ccm oder 1,26 Proz. für Aspergillus,
21,8 ccm oder 1,30 Proz. für Penicillium.

Die Stärke der Säuren verhält sich wie 1 : 0,6 : 0,013, während die Mittelwerte der hemmenden Konzentrationen sich verhalten wie 1,02 : 1,70 : 2,54.

Nikitinsky (l. c. S. 16) gibt als obere Grenze der Acidität für Aspergillus 0,477 Proz. Normal-HCl und 1,201 Proz. Normalschwefelsäure an. Nach Clark[1]) beträgt der Grenzwert für die Sporenkeimung von Aspergillus niger 0,5 bis 0,8 Proz. Normalsalzsäure und 0,6 Proz. Normal-H_2SO_4. Die Werte stimmen also im allgemeinen überein. Bemerkt sei, daß auch Clark über ein „Penicillium glaucum“ verfügte, welches säurefester war als Aspergillus niger.

Alle Tatsachen lassen keinen anderen Schluß zu, als daß unsere Deutungen richtig sind und sehr häufig eine Anhäufung von Wasserstoffionen oder Hydroxylionen durch die Aufnahme bestimmter Salzbestandteile seitens der Schimmelpilze im Substrate stattfinden kann. Man darf deshalb von vitaler Säure- und Alkalibildung durch diese Organismen sprechen.

[1]) Clark, Journ. of Physic. Chemistry 3, 263 (1899).

XVII.

Über den Glykosaminkohlensäureäthylester und sein Schicksal im Stoffwechsel des pankreasdiabetischen Hundes.

Von Dr. J. Forschbach,
Assistent an der inneren Abteilung des Augustahospitals in Köln
(Oberarzt: Prof. Dr. Matthes).

1. Frühere Versuche mit Glykosamin.

Das Glykosamin ist das einzige Kohlehydrat, das fast regelmäßig einen Baustein des Eiweißes darstellt. Sein Schicksal bei Einführung in den Tierkörper beansprucht besonderes Interesse, da es uns möglicherweise über die Beziehungen zwischen Eiweiß und Kohlehydrat im intermedären Stoffwechsel Aufschluß zu geben vermag.

Die bisherigen Arbeiten über die Verwertung des Glykosamins[1]) im Körper des Tieres und des Menschen beschäftigen sich vorwiegend mit der Frage: Ist der im Molekül vieler Eiweiße enthaltene Komplex des Glykosamins ein Glykogenbildner?

Fabian[2]) hat zuerst durch drei Versuche festgestellt, daß die Leber von Hungerkaninchen nach Darreichung von 15 g salzsauren Glykosamins keine größeren Glykogenmengen enthält, als die eines Kontrolltieres. Offer und Fränkel[3]), die ebenfalls salzsaures Glykosamin verfütterten, kamen zu den gleichen Resultaten.

Cathcart[4]) sprach die Vermutung aus, daß das salzsaure Salz im Organismus vielleicht die Rolle einer körperfremden Substanz spiele und sich anders verhalte wie das freie, durch Abbau des Eiweißmoleküles entstandene, überaus leicht zersetzliche Glykosamin. Er stellte daher aus dem Glykosaminchlorhydrat die freie Base dar,

---

[1]) Die Literatur ist größtenteils bei Fr. Müller, Zeitschr. f. Biol. 24 (Neue Folge), angeführt.

[2]) Fabian, Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 167.

[3]) Offer und Fränkel, Centralbl. für Physiol. 13 (1899).

[4]) Cathcart, Zeitschr. f. physiol. Chemie 39, 423.

erzielte aber damit bei Hungerkaninchen ebensowenig Glykogenansatz, wie Fabian, Offer und Fränkel mit dem salzsauren Salz.

Cathcart hat weiter die Verwertung der aus Glykosaminchlorhydrat gewonnenen Chitose untersucht. Er fand nach Verfütterung von 5 g Chitose an Hungerkaninchen Leberglykogenzahlen, die von den an Kontrolltieren gewonnenen Werten so wenig differieren, daß diesem Ergebnis mit Rücksicht auf den schwankenden Glykogengehalt von Hungertieren wohl nur geringe Beweiskraft beizumessen ist.

Zu der Frage, in welchem Umfange der Tierkörper überhaupt das Glykosamin verwertet, enthalten die schon erwähnten Arbeiten von Fabian, Offer und Fränkel mehrere Angaben.

Fabian verabreichte einem Kaninchen 15 g salzsaures Glykosamin und fand 12 Stunden nachher 31 Proz. davon im Darmkanal des getöteten Tieres wieder. Von 15 bis 20 g des Salzes wurden in verschiedenen Versuchen 26, 5, 2, 18 Proz. im Urin wieder ausgeschieden.

Offer und Fränkel sahen schon von 10 g des Chlorhydrats bei einem Hunde 20 Proz. im Harn wiedererscheinen, während Lüthje [1]) einem Menschen 8 g davon verfüttern konnte, ohne eine optisch aktive oder reduzierende Substanz im Harn zu beobachten. Erstere Autoren heben namentlich die heftige diarrhoische Wirkung des salzsauren Glykosamins sowohl beim Hunde, wie beim Menschen hervor. Auffallend sind die Erfahrungen Baumgartens [2]). Ein kräftiger Mann und ein mittelkräftiges Mädchen lieferten nach Quantitäten von 20, 30, 40 und 50 g salzsauren Glykosamins einen Urin, der weder drehte noch reduzierte; ebenso verhielten sich zwei Diabetiker. Ein gesunder und ein pankreasdiabetischer Hund schieden von 30 etwa 7 g im Urin wieder aus. Ob bei den Versuchspersonen und den Hunden die allgemein durch Glykosaminderivate verursachten Diarrhöen bestanden haben, gibt Baumgarten nicht an. Da Fabian bei Kaninchen, wie oben erwähnt, 31 Proz. des zugeführten salzsauren Salzes im Darmkanal wiederfand, so wäre wohl zur Beurteilung der Verbrennungsgröße eine Kotuntersuchung erforderlich gewesen.

Bei der Beurteilung der Versuche von Fabian, Offer und Fränkel, die durch Zufuhr von salzsaurem Glykosamin Glykogenansatz zu erzeugen suchten, weist Friedrich Müller [3]) darauf hin,

[1]) Zit. nach Fr. Müller, Zeitschr. f. Biol. 24, 544 (Neue Folge).
[2]) Baumgarten, Zeitschr. f. exp. Path. u. Therap. 2, 64.
[3]) Müller, Zeitschr. f. Biol. 24.

daß man auf Grund der mangelhaften Verwertung des salzsauren Salzes keineswegs zu dem Schlusse berechtigt sei, auch von dem im großen Molekülverbande des Eiweißes vorhandenen Atomkomplexe des Glykosamins das gleiche vorauszusetzen.

„Aus anderen Beispielen wissen wir, daß dieselbe Substanz, welche, für sich allein aufgenommen, den Tierkörper unzersetzt durchwandert, dann leicht und vollständig oxydiert wird, wenn sie im Verbande eines größeren Moleküles dem Organismus einverleibt wird.“ Man möchte hinzufügen: Um so mehr wird man außerdem den physiologischen Bedingungen entgegenkommen, wenn man den reaktionsfähigen Gruppen der zu prüfenden Substanzen solche Bindungen gibt, wie sie in vielen Molekülverbänden des Organismus wiederkehren, wie sie dem Stoffwechsel adäquat sind.

Für alle die Fälle nun aber, in welchen die Einverleibung durch den Magendarmkanal geschieht, muß neben der genannten Bedingung noch eine zweite erfüllt werden: Der erste Schritt auf dem Wege zur Verbrennungsstätte muß der Substanz leicht sein, d. h. sie muß vom Darme genügend resorbiert werden.

Ob die freie Base und die Chitose dieser Forderung genügen, ist aus der einschlägigen Arbeit von Cathcart nicht zu ersehen; das salzsaure Salz scheint nach dem Urteil der meisten Autoren nur sehr unvollkommen vom Darme aufgenommen zu werden.

Seitdem durch die modernen Forschungen über die Konstitution des Eiweißes klargestellt ist, daß bei seinem Aufbau die –NH–CO-Bindung eine bedeutende Rolle spielt, indem die Aminosäuren in amidartiger Bindung miteinander verknüpft sind, lag der Versuch nahe, ein Additionsprodukt des Glykosamins herzustellen, in welchem die Aminogruppe in –CO-Bindung steht. Gleichzeitig wurde mit der Möglichkeit gerechnet, daß ein derartiger Körper geringere diarrhoische Wirkung entfalte, als das salzsaure Salz des stark basischen Ausgangsmateriales.

Herr Prof. Spiro (Straßburg) gab mir den Rat, die Addierung eines Harnstoffs zu versuchen, wobei noch das eine Moment maßgebend war, daß die Harnstoffkomponente dem Organismus überaus adäquat ist und ohne weiteres eliminiert wird.

Es erschien also wünschenswert, zu einem Körper von der Konstitution: $CH_2OH(CHOH)_3.CH.COH$ zu gelangen.

$$CH_2OH(CHOH)_3.\underset{\displaystyle CO<^{NH}_{NH_2}}{\underset{|}{CH}}.COH$$

Es sei erwähnt, daß bereits die von Steudel[1]) hergestellte Verbindung des Phenylisocyanats mit dem Glykosamin die genannte Gruppe (–NH–CO–) enthält. Es zeigte sich aber, daß ein Produkt von der Konstitution $CH_2OH.(CHOH)_3.CH.COH$ leicht veränderlich ist und erst durch Kochen

$$CH_2OH.(CHOH)_3.\underset{\displaystyle CO<{NH \atop NH.C_6H_5}}{\underset{|}{CH}}.COH$$

mit 20proz. Essigsäure eine beständige Verbindung erhalten werden kann, welche dem Anhydrid von der Formel $CH_2OH.(CHOH)_3.C=C\text{–}H$ entspricht.

$$CH_2OH.(CHOH)_3.\underset{\displaystyle (OH)C{<\!\!\!\!<}{N \atop N.C_6H_5}}{\underset{|}{C}}=C\text{–}H$$

Der Körper war aber für den von uns verfolgten Zweck weniger geeignet, weil durch die Anhydridbildung die charakteristische Aldehydgruppe nicht zur Geltung kommt.

2. Chemischer Teil.

Die auf Darstellung des Harnstoffderivats gerichteten Versuche wurden Ende 1904 im chemischen Laboratorium des Herrn Dr. Weil (München) begonnen.

Das salzsaure Glykosamin gewann ich in größeren Quantitäten aus Hummerschalen nach einem Verfahren, welches von dem Ledderhoses[2]) nur unbedeutend abweicht:

Die zerkleinerten, entkalkten Hummerschalen wurden 7 bis 8 Stunden mit konzentrierter Salzsäure gekocht; dann wurde die schwarze, schlammige Masse mit Wasser verdünnt und in demselben Kolben unter Kochen mit Tierkohle entfärbt. Ich saugte die stark saure Lösung durch ein säurefestes Filter und dampfte die fast farblose Lösung ein. Aus der Lösung kristallisieren neben salzsaurem Glykosamin große Mengen Gips; dieser läßt sich leicht durch wiederholtes Umkristallisieren des Rückstandes aus heißem Wasser beseitigen.

Es wurde zunächst versucht, eine Umsetzung des Glykosaminchlorhydrats mit CONK nach dem Vorbilde der Wöhlerschen Harnstoffsynthese zu erzielen.

$$CH_2OH.(CHOH)_3.\underset{\displaystyle NH_2.HCl}{\underset{|}{CH}}\text{—}CHO + KCON = CH_2OH(CHOH)_3.\underset{\displaystyle CO<{NH \atop NH_2}}{\underset{|}{CH}}.CHO + KCl$$

Dieser Versuch scheiterte. Nach mehreren anderen Bemühungen gelang die Umsetzung des Monochlorkohlensäureäthylesters mit der Aminogruppe des Glykosamins im Sinne folgender Reaktion:

$$CH_2OH.(CHOH)_3.\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}\text{—}CHO + CO<{Cl \atop O.C_2H_5} = CH_2OH.(CHOH)_3.\underset{\displaystyle CO<{NH \atop O.C_2H_5}}{\underset{|}{CH}}.CHO + HCl$$

[1]) Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chemie 34, 353.
[2]) Ledderhose, ebenda 2, 213.

Zur Bindung der bei der Reaktion entstehenden Salzsäure wurde Bleioxyd verwandt.

Wenn man eine in der Kälte etwa halb gesättigte Lösung von salzsaurem Glykosamin in einer Flasche mit einem Überschuß von fein gepulvertem, reinem Bleioxyd unter allmählichem Zusatz der berechneten Menge Monochlorkohlensäureäthylester schüttelt, so entsteht bereits nach einer Viertelstunde eine weiße Fällung von $PbCl_2$. Bleibt nach etwa $^1/_2$stündigem Schütteln noch ein Rest unveränderten Bleioxyds auf dem Boden des Glases zurück, so kann man annehmen, daß alles Chlor gebunden ist. Ungefähr gleichzeitig verschwindet auch der stechende Geruch des Chlorkohlensäureesters. Um geringe Mengen gelösten Bleichlorids vollends auszufällen, fügt man der Mischung das gleiche Volum absoluten Alkohols zu und filtriert vom Chlorblei ab. Aus der verdünnten alkoholischen Lösung bilden sich nach dem Eindampfen beim Erkalten lockere, gelatinös aussehende Klumpen, die sich beim Absaugen in blendend weiße Kristalle verwandeln.

Die wässerige, chlorfreie Lösung des reinen Körpers reagiert auf Lackmus neutral. Die reinen Kristalle sind in heißem Wasser leicht löslich. Eine heiß gesättigte, wässerige Lösung bleibt 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen: 5 ccm des Filtrats enthalten 1,6330 g Substanz, 100 ccm einer kalt gesättigten Lösung entsprechen also 32,66 g.

In 99,8proz. Alkohol ist die Löslichkeit geringer.

Eine heiß gesättigte alkoholische Lösung bleibt 11 Stunden bei Zimmertemperatur stehen: 2 ccm des Filtrats enthalten 0,0535 g Substanz, 100 ccm einer kalt gesättigten Lösung entsprechen demnach 0,2675 g.

In Äther und Benzol ist die Substanz unlöslich.

Sie bräunt sich bei 165° C und schmilzt zwischen 166° und 167° unter Geruch nach Karamel.

Eine 14,8515proz. wässerige Lösung des Körpers drehte bei 10,25° C im 2 dcm-Rohr um 9,855° nach rechts, demnach ist die spezifische Drehung: $\alpha_{(D)} = 33{,}18°$.

Die Substanz gibt die Molischsche Furfurolreaktion, nicht aber die Dimethylamidoparabenzaldehydreaktion Ehrlichs, ist nicht gärungsfähig, zersetzt sich mit Laugen unter Karamelgeruch und reduziert Wismut- und Kupfersalze.

Es wurde zu 60 ccm siedender Fehlingscher Lösung, verdünnt mit 60 ccm Wasser, eine Lösung Glykosaminkohlensäureäthylester hinzugesetzt, welche in 30 ccm H_2O 0,2986 g Substanz enthielt, die ganze Lösung zwei Minuten gekocht und das gebildete Cu_2O durch Glühen im Luftstrom in CuO verwandelt. 0,2986 g Substanz lieferten einmal 0,2260, in der Parallelbestimmung 0,2276 g Kupferoxyd.

Das Reduktionsvermögen ist demnach geringer als das des Traubenzuckers.

Die Elementaranalyse gab folgende Werte:

Berechnet für $C_9H_{17}O_7N$:		Gefunden:
C . . .	42,99 Proz.	43,71 Proz.[1]
H . . .	6,82 „	6,93 „
N . . .	5,59 „	5,69 „ [2]

Daß in der Verbindung die Aminogruppe des Glykosamins besetzt ist, läßt sich daraus entnehmen, daß sie mit Säuren nicht leicht Salze bildet. Setzt man nämlich einer wässerigen Lösung der Substanz etwa den 40. Teil der berechneten Salzsäuremenge hinzu, so läßt sich noch tagelang die freie Salzsäure durch Safrosinpapier nachweisen.

Erhitzt man im siedenden Wasserbade eine wässerige Lösung der Substanz mit entsprechenden Mengen salzsauren Phenylhydrazins und essigsaurem Natron etwa 1 Stunde lang, so entsteht bald nach dem Abkühlen ein voluminöser Niederschlag rotbrauner Kristalle, welcher mikroskopisch einem Osazon ähnlich sieht. Das Phenylhydrazinprodukt ist in heißem Wasser nicht sehr leicht löslich. Eine heiß gesättigte wässerige Lösung enthielt nach 48 Stunden bei Zimmertemperatur in 5 ccm 0,0028 g Substanz; demnach enthalten 100 ccm einer kalt gesättigten Lösung 0,056 g.

In heißem Alkohol ist es leichter löslich als in Wasser. Eine heiß gesättigte alkoholische Lösung enthielt nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur in 3 ccm Lösung 0,0652 g Substanz; also enthalten 100 ccm einer kalt gesättigten Lösung 2,173 g. In Benzol löst sich der Körper sehr wenig; in Äther ist er unlöslich.

Die mehrmals aus Alkohol umkristallisierte und dann im Exsikkator getrocknete Substanz schmilzt scharf bei 180 bis 181° C. Die Bemühung, die spezifische Drehung des Phenylhydrazinproduktes festzustellen, war wegen der starken Eigenfarbe fruchtlos.

Die Elementaranalyse der Substanz ergab folgendes:

0,1240 g gaben 0,2803 g CO_2 und 0,0667 g H_2O
0,1022 g „ 0,2308 g CO_2 „ 0,0568 g H_2O

0,1824 g lieferten 0,02226 g N } Kjeldahl
0,1674 g „ 0,02072 g N }

Gefunden:			Berechnet für $C_{12}H_{14}O_3N_2$:	
C . . .	61,65	61,59	C . . .	61,49 Proz.
H . . .	5,98	6,22	H . . .	6,02 „
N . . .	12,20	12,38	N . . .	11,99 „

[1]) 0,1472 g gaben 0,2359 g CO_2 und 0,0912 H_2O.
[2]) 0,1562 g gaben 7,9 ccm N bei 10° C und 709 mm Hg.

Diese Analyse paßt auf einen Körper, dem die Formel $C_{12}H_{14}O_3N_2$ zukommt. Einem aus dem Ester $C_9H_{17}O_7N$ und Phenylhydrazin $C_6H_8N_2$ entstehenden Hydrazon, an das wohl zuerst gedacht wurde, käme die Formel $C_{15}H_{23}O_6N_3$ zu. (Die Möglichkeit einer Osazonbildung können wir des Stickstoffgehaltes des Produktes und seines Schmelzpunktes wegen außer Betracht lassen.) Nach der Analyse wird also der Körper $C_{15}H_{23}O_6N_3$ nicht nur um ein Molekül H_2O, sondern auch noch um die Gruppe $C_3H_7O_2N$ ärmer.

$$C_{15}H_{23}O_6N_3 - H_2O = C_{15}H_{21}O_5N_3$$
$$C_{15}H_{21}O_5N_3 - C_{12}H_{14}O_3N_2 = C_3H_7O_2N.$$

Bei der abgespaltenen Gruppe $C_3H_7O_2N$ dürfte es sich nur um die Gruppe $NH_2{-}CO{-}OC_2H_5$, das Urethan, handeln, da eine andere stickstoffhaltige Atomgruppierung im Ester nicht vorhanden ist. Diese Gruppe ist also im Reagenzglase leicht abspaltbar, was einer Umprägung des Glykosamins in den entsprechenden Zucker entspricht. An welcher Stelle des Moleküls die H_2O-Abspaltung stattfindet, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die Bemühungen, den Glykosaminkohlensäureester mit einer gesättigten alkoholischen Ammoniaklösung zu verseifen, demnach zu dem Harnstoffderivat des Glykosamins zu gelangen, waren bisher nicht von Erfolg. Ich kochte eine Lösung des Esters in verdünntem Alkohol mehrere Stunden am Rückflußkühler mit alkoholischer Ammoniaklösung, gewann aber den Ester unverändert zurück.

Da es für die physiologischen Untersuchungen hauptsächlich auf die $-NH-CO$-Bindung ankam und im Falle einer Desamidierung dieses Glykosaminderivats die Komponente $-NH-CO-O.C_2H_5$ ebenso leicht verarbeitet würde, wie das Amid, so glaubte ich zunächst, das Schicksal des Esters im Tierkörper prüfen zu sollen.

3. Physiologischer Teil.

Ein einwandfreier Nachweis, daß aus einer dem Organismus zugeführten Substanz im Körper Zucker entsteht, läßt sich nach dem heutigen Stande der Forschung durch keine Untersuchungsmethode erbringen. So viel wissen wir aus früheren, namentlich aber den neuesten Untersuchungen Lüthjes[1]), daß die Zuckermengen, die ein pankreasdiabetisches Tier im Hunger oder bei

[1]) Lüthje, Deutsch. Arch. für klin. Mediz. 79, 499. — Pflügers Archiv 106, 160.

reiner Eiweißkost ausscheidet, nicht aus dem präexistierenden Glykogen abgeleitet werden können, sondern daß aus Nichtkohlehydraten Glykose neu gebildet werden muß. Die jüngst erschienene Arbeit von Mohr[1]) hat diese Tatsache bestätigt. Zur Frage der Zuckerbildung aus den Aminosäuren hat Embden[2]) den Beweis führen können, daß die Zufuhr von Alanin beim pankreasdiabetischen Hunde nicht durch Beeinflussung der vorhandenen Glykogendepots der Leber zuckerbildend wirkt. Es bleibt aber noch die Möglichkeit, daß diese Substanzen solche Nichtkohlehydrate sparen, welche Kohlehydrate zu bilden imstande sind.

Selbstverständlich kommen diese Gesichtspunkte auch bei unseren Versuchen mit dem Glykosaminkohlensäureester in Betracht.

Ein positives Ergebnis — Steigerung der Zuckerausscheidung nach Verfütterung einer Substanz — bleibt demgemäß vieldeutig, ein negatives Resultat macht dagegen in hohem Grade wahrscheinlich, daß aus der Substanz im Körper in keiner Weise Zucker wird, es sei denn, daß der aus anderen Substanzen im Stoffwechsel eines pankreasdiabetischen Tieres gebildete Zucker leichter verbrannt wird, als etwa durch die Nahrung zugeführter.

Namentlich im Hinblick auf einen Vergleich mit der Aminosäurenfütterung erschien die Verfütterung des Glykosaminkohlensäureesters an pankreasdiabetische Hunde von Interesse.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Ich brachte pankreasdiabetische Hunde durch eine gleichmäßige Eiweißkost (abgewogene Mengen möglichst fettfreien, gekochten Pferdefleisches mit entsprechenden Quantitäten möglichst fettfreier Bouillon) auf eine langsam abfallende Zuckerausscheidung. Sobald die sinkende Tendenz ausgesprochen war, wurde den Tieren in der gewöhnlichen Nahrung eine größere Quantität Glykosaminkohlensäureäthylester[3]) gereicht.

Die Urinmengen wurden alle 24 Stunden abgegrenzt; in Versuch I entleerte der Hund den Urin spontan in den Käfig, in Versuch II teils spontan, teils wurde er durch den Katheter entleert. Zu Ende eines jeden Tages wurde der Stoffwechselkäfig sorgfältig mit destilliertem Wasser ausgespritzt und die Waschwässer mit dem gemessenen Urin auf ein bestimmtes Volum gebracht. In diesem

[1]) Mohr, Zeitschrift für exper. Path. u. Therap. 2, 463.

[2]) Embden, Diese Beiträge 7, 298.

[3]) Größere Mengen des Esters stellte mir in vorzüglichster Reinheit das chemische Laboratorium von Herrn Dr. Weil, München, Herzog Rudolphstraße 18, dar.

Volum (auf welches sich die in den Tabellen eingeklammerten Werte beziehen), bestimmte ich die Drehung vor und nach der Vergärung in Prozenten Traubenzucker und den Stickstoff nach Kjeldahl. Da sich an allen dem Versuche vorausgehenden Tagen der Urin außer Traubenzucker frei von rechtsdrehenden Substanzen erwies, so hielt ich mich für berechtigt, eine nach Verfütterung des Esters und nach der Vergärung bleibende Rechtsdrehung auf eine Ausscheidung der zugeführten Substanz zu beziehen. Erwähnt sei noch, daß die Hunde in der Nähe eines Gasheizofens bei ziemlich konstanter Temperatur gehalten wurden.

Versuch I.

Einem 10,200 g schweren männlichen Spitzhunde in gutem Ernährungszustande wurde am 25. November 1905 das Pankreas vollständig exstirpiert. Die Operation war um 4^h p. m. beendigt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Datum	Harnmenge in ccm	Spezifisches Gewicht	Drehung = Proz. Dextrose	Drehung nach Vergärung = Proz. Dextrose	Zucker in g	N in Proz.	N g	$\frac{D}{N}$	Fütterung	Bemerkungen
27. bis 28. XI.	418 (1000)	1059	6,93 (+2,9)	(0)	29,0	2,532	10,584	2,74	Etwa 40 g gehacktes Filet.	
28. bis 29. XI.	477 (1000)	1056	7,02 (+3,3)	(—0,05)	33,5	2,665	12,714	2,634	125 g Pferdefleisch.	Im Urin eine Spur Albumen.
29. bis 30. XI.	578 (1000)	1057	7,613 (+4,4)	(0)	44,0	2,902	16,772	2,623	200 g Pferdefleisch.	
30. XI. bis 1. XII.	415 (1000)	1062	8,674 (+3,55)	(—0,05)	36,0	3,323	13,790	2,610	200 g Pferdefleisch.	
. bis 2. XII.	425 (1002)	1068	9,548 (+4,0)	(—0,05)	40,58	3,343	14,271	2,843	200 g Pferdefleisch.	
. bis 3. XII.	317 (1000)	1074	10,410 (+3,3)	(0)	33,0	4,045	12,824	2,573	200 g Pferdefleisch.	
. bis 4. XII.	325 (1000)	1071	10,00 (+3,25)	(0)	32,5	3,498	11,368	2,859	200 g Pferdefleisch.	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Datum	Harnmenge in ccm	Spezifisches Gewicht	Drehung = Proz. Dextrose	Drehung nach Vergärung = Proz. Dextrose	Zucker in g	N in Proz.	N g	$\frac{D}{N}$	Fütterung	Bemerkungen
4. b. 5. XII. a)	(2000)	—	(+1,7)	(+0,6)	22,0	—	—	—	200 g Pferdefleisch.	Kein Erbrechen.
b)	(2000)	—	(+0,4)	(+0,1)	+6,0 28,0	—	—	—	Um 4 Uhr am 4. XII. 40 g Glykosaminkohlensäureest.	Nachts geringer Durchfall; Urin mit Kot verunreinigt.
5. bis 6. XII.	120 (500)	1054	7,916 (+1,9)	(0)	9,5	—	—	—	Keine Nahrung.	Tier sehr elend. Am 6. XII. abends 10 Uhr Tod in Coma.

Erläuterung der Tabelle I.

Der Tag rechnet von 4 zu 4 Uhr nachmittags. Am 1. Dezember beginnt die Zuckerausscheidung zu sinken; die Werte lauten für diesen und die folgenden Tage: 40,58; 33,0; 32,5 g. Am 4. Dezember bekommt der Hund 40 g Glykosaminkohlensäureäthylester auf einmal in einem Teil seiner Nahrung. Da der Urin in der folgenden Nacht durch dünnen Kot verunreinigt wurde, so filtrierte ich die Mischung, wusch die Kotmassen und die Filter mit heißem Wasser aus und erhielt zwei Fraktionen zu je 2000 ccm (a und b). Bei Fraktion a) blieb von der Rechtsdrehung = 1,7 Proz. Traubenzucker, nach der Vergärung eine solche = 0,6 Proz. Traubenzucker, bei der Fraktion b) von einer Rechtsdrehung = 0,4 Proz. Traubenzucker eine solche = 0,1 Proz. zurück. Die ausgeschiedene Zuckermenge berechnete sich demnach am Versuchstage auf 28,0 g.

Ob die nach Vergärung bleibende Rechtsdrehung auf Kot oder Urin zu beziehen war, ist nicht zu entscheiden. Nehme ich an, daß der Glykosaminester unverändert durch Darm oder Urin wieder ausgeschieden ist, so läßt sich unter Zugrundelegung der spezifischen Drehung des Esters dessen Menge annähernd (eine etwa bestehende Linksdrehung muß natürlich vernachlässigt werden) bestimmen.

Da eine 1 proz. Dextroselösung einer 1,5822 proz. Glykosaminesterlösung an Drehvermögen entspricht, so verließen in Fraktion a) 18,9864 g, in b) 3,1644 g, zusammen 22,15 g Substanz den Körper unverbraunt. Ungefähr 18 g wurden verbrannt.

Für den folgenden Tag sank bei Verweigerung der Nahrung die Zuckerausscheidung auf 9,5. Nach Vergärung des Urins war keine Rechtsdrehung nachweisbar.

Es erschien nun wünschenswert, beim folgenden Versuch an einem etwas schwereren Hunde die Assimilationsgrenze für den

Ester nicht zu überschreiten. Es wurden daher diesem Tiere nur 20 g Substanz gereicht, und zwar diesmal in 4 Portionen, welche auf die ersten 6 Stunden des Versuchstages verteilt wurden.

Versuch II.

Einem 13,800 g schweren männlichen Pudelhunde wurde am 5. Januar 1906 das Pankreas vollständig exstirpiert. Die Operation war um 7h p. m. beendigt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Datum	Harnmenge in ccm	Spezifisches Gewicht	Drehung = Proz. Dextrose	Drehung nach Vergärung = Proz. Dextrose	Zucker in g	N in Proz.	N g	$\frac{D}{N}$	Fütterung	Bemerkungen
13. bis 14. I.	600 (2000)	1063	8,666 (+2,6)	(0)	52,0	3,150	18,90	2,751	270 g gekochtes Pferdefleisch.	Einige Tropfen Urin verschüttet.
14. bis 15. I.	500 (2000)	1064	8,800 (+2,2)	(0)	44,0	3,052	15,26	2,883	270 g gekochtes Pferdefleisch.	
15. bis 16. I.	555 (2000)	1064	9,189 (+2,5)	(—0,05)	51,0	2,850	15,82	3,223	270 g gekochtes Pferdefleisch.	
16. bis 17. I.	575 (2000)	?	8,346 (+2,35)	(—0,05)	48,0	2,922	16,80	2,857	270 g gekochtes Pferdefleisch.	
17. bis 18. I.	520 (2000)	1061	8,269 (+2,15)	(0)	43,0	2,989	15,54	2,766	270 g gekochtes Pferdefleisch.	
18. bis 19. I.	460 (2000)	1066	8,913 (+2,05)	(0)	41,0	3,348	15,40	2,662	270 g gekochtes Pferdefleisch + 20 g Glykosaminkohlensäureester in 4 Portionen.	Kein Erbrechen. Kein Durchfall. Tier sehr munter.
19. bis 20. I.	335 (2000)	1070	8,955 (+1,5)	(0)	30,0	3,761	12,60	2,381	120 g roh. 150 g gekochtes Pferdefleisch.	
20. bis 21. I.	255 (1000)	1064	6,471 (+1,65)	(0)	16,5	3,129	7,98	2,07	270 g rohes Pferdefleisch.	Tier schläft viel, zeigt geringere Freßlust. Am 21. nachm. wird das zieml. elende Tier getötet.

Erläuterung zu Tabelle II.

Der Tag rechnet von 8 zu 8 Uhr vormittags.

Vom 15. Januar ab fallen die Zuckerwerte allmählich: 51,0; 48,0; 43,0 g. Am 18. Januar wurden dem Tiere zwischen 8^h a. m. und 2^h p. m. in 4 Portionen im Pferdefleisch im ganzen 20 g Glykosaminkohlensäureester verabreicht. Es traten weder Erbrechen noch Durchfall auf. Nach Vergärung betrug die Drehung des Harnes 0. Die Zuckerausscheidung sank auf 41,0 g. Der Kot wurde gesammelt, im Mörser mit heißem Wasser unter Zerdrücken der Kotballen angerührt. Das wenig gefärbte Filtrat zeigte keine Drehung. Am folgenden Tage sinkt die Zuckerausscheidung auf den Wert 30,0. Nach Vergärung zeigte der Urin keine Rechtsdrehung. Die Kotuntersuchung zeigte das gleiche Ergebnis wie am Vortage.

Aus den vorstehenden Untersuchungen geht hervor, daß pankreasdiabetische Hunde größere Quantitäten des Glykosaminkohlensäureäthylesters verbrennen. Die Zuckerausscheidung der Tiere erfährt aber durch die Zufuhr dieser Substanz keinerlei Steigerung. Wie das Sinken der Quotienten $\frac{D}{N}$ (relatives Sinken der N-Ausscheidung am 19. und 20. Tage) zeigt, wird der mit dem Ester zugeführte Stickstoff an den beiden Nachtagen wahrscheinlich eliminiert. Trotz weitgehender Verbrennung kommt das Glykosamin auch in einer Bindung, in der es wohl im Eiweißmolekül enthalten ist, für den Glykosestoffwechsel nicht in Betracht. Diese Tatsache scheint mir ein wichtiger Beitrag zu der Frage, ob Aminosäuren lediglich durch ihren Gehalt an Aminogruppen die Zuckerausscheidung des pankreasdiabetischen Tieres steigern. Es ist bemerkenswert, daß sich die stickstoffhaltige Aminohexose nach dieser Richtung keineswegs analog den Aminosäuren verhält. Der Grund für dieses Verhalten des Glykosamins muß in seiner chemischen Konstitution liegen. Während, wie der Hydrazinversuch zeigt, im Reagenzglase die Abspaltung des stickstoffhaltigen Restes leicht vonstatten geht, verfährt der Organismus bei der Zerstörung des Esters offenbar anders. Vielleicht greifen die spaltenden Kräfte nicht an der Aminogruppe, sondern an einer anderen Stelle des Moleküls an. Die naheliegende Vorstellung, daß die Spaltung im Körper zwischen dem β- und γ-Kohlenstoffatom vor sich geht (Knoop[1]) und es zur Bildung von Glykokollester und Erythrit kommt, ist nach den Mitteilungen Wiechowskis[2]) einer experimentellen Untersuchung zugänglich.

---

[1]) Knoop, Diese Beiträge 6, 150.
[2]) Wiechowski, Diese Beiträge 7, 204.

Durch die vorstehende Untersuchung ist nachgewiesen, daß Glykosamin vom Organismus verbrannt und auch vom pankreasdiabetischen Hunde nicht zur Zuckerbildung verwertet wird, wenn es in einer Form verfüttert wird, die seiner mutmaßlichen Bindung im Eiweiß adäquat ist, wenn es amidartig mit einer Säuregruppe verknüpft ist. Ob das Glykosamin Beziehungen zur Glykuronsäurebildung hat, sollen weitere Untersuchungen zu entscheiden suchen.

Zum Schlusse sei mir gestattet, Herrn Prof. Dr. Spiro in Straßburg für die Anregung dieser Arbeit sowie auch für seine freundschaftliche Unterstützung derselben meinen allerverbindlichsten Dank auszusprechen.

Der physiologische Teil dieser Arbeit ist mit den Mitteln des Augustahospitals in Köln ausgeführt.

XVIII.

Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweißabkömmlinge.

Vierte Mitteilung.

Überführung von Eiweißcystin in α-Thiomilchsäure.

Von **E. Friedmann** und **Julius Baer.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

In einer früheren Mitteilung hat der eine von uns[1]) eine Methode beschrieben, nach der es gelingt, die einmal von Suter[2]) aus gefaulten Tyrosinmutterlaugen dargestellte α-Thiomilchsäure unter den durch Salzsäurezersetzung der Keratinsubstanzen erhaltenen Spaltungsprodukten in konstanter Weise aufzufinden. Bei der Deutung dieses Befundes wurde darauf aufmerksam gemacht, daß der zur Isolierung der α-Thiomilchsäure eingeschlagene Weg nicht einwandfrei war und die Möglichkeit erwogen, daß diese Substanz „erst[3]) unter dem Einfluß des Alkali aus anderen, primär in den Zersetzungsflüssigkeiten vorhandenen Schwefelverbindungen abgespalten" worden war. Als Muttersubstanz der α-Thiomilchsäure wurde „eine dem α-Cysteïn der Merkaptursäuren nahestehende Verbindung"[4]) vermutet, da zu dieser Zeit noch die Richtigkeit der Baumannschen Merkaptursäureformel nicht zu bezweifeln war. Als später nachgewiesen war, daß die Konstitution der Merkaptursäuren[5]) eine andere ist, als Baumann angenommen hatte, und durch ihre Synthese vom Eiweißcystin aus der Nachweis erbracht war, daß dem Eiweißcystin und den Merkaptursäuren dasselbe β-Cysteïn zugrunde lag, fiel die Berechtigung der

[1]) E. Friedmann, Diese Beiträge 3, 184.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 577.

[3]) l. c. S. 191.

[4]) E. Friedmann, Ergebnisse d. Physiologie 1, 29.

[5]) E. Friedmann, Diese Beiträge 4, 486.

Annahme eines α-Cysteïns als Muttersubstanz der α-Thiomilchsäure und es erhob sich „die Frage, ob die geschwefelte Vorstufe der α-Thiomilchsäure nicht im Cystin selber zu suchen wäre“, da „die Bedingungen, unter denen diese Säure bisher aufgefunden und isoliert worden“ war, „die Möglichkeit einer Umwandlung des β-Cysteïnes in α-Thiomilchsäure nicht völlig“ ausschlossen.

Die Frage nach der Herkunft der α-Thiomilchsäure wurde von dem einen von uns in dem Sinne gelöst, daß in der Tat das Eiweißcystin unter bestimmten Bedingungen in α-Thiomilchsäure übergehen kann [1]). Zu demselben Resultat ist K. A. H. Mörner [2]), unabhängig und ohne Kenntnis der letzteren Mitteilung gelangt. Diese Untersuchung Mörners bildet den Ausgangspunkt für die unten zu beschreibenden Versuche.

Mörner erhitzte Cysteïnchlorhydrat in wässeriger Lösung (Konzentration weniger als 2 Proz.) etwa eine Stunde im Siedetopf auf 140 bis 145°. Aus der Reaktionsflüssigkeit konnten α-Thiomilchsäure in 13 proz. Ausbeute, r-Alanin und in einem Falle ein Hydrazon, das auf die Anwesenheit von Brenztraubensäure hindeutete, isoliert werden. Außerdem wurden Ammoniak und Schwefelwasserstoff erhalten. Mörner gibt seinen Befunden eine vorläufige Deutung [3]), nach der in dem bearbeiteten Cystin sowohl die α-Amino-β-Thiomilchsäure (Formel I) wie die β-Amino-α-Thiomilchsäure (Formel II) vielleicht zu gleicher Menge gleichzeitig vorkommen:

I.	II.
$CH_2.SH$	$CH_2.NH_2$
$\vert$	$\vert$
$CH.NH_2$	$CH.SH$
$\vert$	$\vert$
$COOH$	$COOH$
α-Amino-β-Thiomilchsäure	β-Amino-α-Thiomilchsäure.

„Bei der Zersetzung werden aus der α-Amino-β-Thiomilchsäure Schwefelwasserstoff und Alanin gebildet; aus der β-Amino-α-Thiomilchsäure wurden Ammoniak und α-Thiomilchsäure gebildet; gleichzeitig dürfte eine Oxydation stattfinden und Cysteïn oder Thiomilchsäure zu Disulfid oxydiert werden.“

Diese Deutung macht zur Erklärung des Auftretens von α-Thiomilchsäure unter den geschilderten Bedingungen die Annahme des Vorhandenseins eines dem Eiweißcysteïn strukturisomeren Cysteïns (β-Amino-α-Thiomilchsäure). Gegen diese Deutung

---

[1]) E. Friedmann, Verhandl. d. Gesellsch. deutsch. Naturforscher u. Ärzte, 75. Versammlung 2, 425.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 349, 365.

[3]) l. c. S. 363.

spricht ein von Mörner selbst angestellter Versuch, bei dem aus einem Cystinpräparat, das aus schönen sechsseitigen Tafeln bestand und dessen optische Drehung $\alpha_D = -223^0$ war, α-Thiomilchsäure erhalten wurde. Ferner ist zu betonen, daß der Reaktionsverlauf, den Mörner zur Erklärung der Bildung von α-Thiomilchsäure und Alanin annimmt, überhaupt nicht zu diesen Substanzen führen kann, sondern es müßten aus Formel I unter Schwefelwasserstoffabspaltung und aus Formel II unter Ammoniakabspaltung ungesättigte Substanzen entstehen:

$$\begin{array}{ll} CH_2 & CH_2 \\ \| & \| \\ C.NH_2 + SH_2 & C.SH + NH_3 \\ | & | \\ COOH & COOH \end{array}$$

aus Formel I — aus Formel II.

Wie diese ungesättigten Körper unter den geschilderten Bedingungen in die genannten gesättigten übergehen können, ist nicht ersichtlich. Daher können, entgegen der Ansicht von Mörner, weder die α-Thiomilchsäure noch das Alanin, selbst unter der Annahme, daß die von Mörner benutzten Präparate Gemenge von zwei strukturisomeren Cysteïnen waren, als unmittelbare Spaltungsprodukte des Cysteïns angesehen werden[1]).

Die Annahme Mörners von dem Vorhandensein eines dem Eiweißcysteïn strukturisomeren Cysteïns ist einer experimentellen Prüfung zugänglich. Da sie lediglich gemacht worden ist, um dem Auftreten von α-Thiomilchsäure unter den Zersetzungsprodukten des Cysteïns Rechnung zu tragen, so ist die Frage nach dem Vorhandensein einer α-Thio-β-Aminomilchsäure gleichbedeutend mit der Frage nach der Herkunft der α-Thiomilchsäure.

Zur Lösung dieser Frage haben wir uns reines Eiweißcystin dargestellt, den Nachweis geführt, daß es ausschließlich aus dem Disulfid der α-Amino-β-Thiomilchsäure bestand, und geprüft, ob dieses Präparat nach der Methode von Mörner α-Thiomilchsäure liefern konnte.

Das zur Verarbeitung kommende Cystin wurde aus Menschenhaaren dargestellt. Es war schneeweiß, frei von Tyrosin und anderen Aminosäuren und bestand aus Plättchen und Rosetten von Plättchen. Zur Prüfung der Reinheit des Präparates stellten wir

[1]) Hierfür spricht auch, daß das von Mörner erhaltene Alanin r-Alanin war, ebenso war die von dem einen von uns aus Menschenhaaren dargestellte Benzyl-α-Thiomilchsäure optisch inaktiv. (E. Friedmann, Diese Beiträge 3, 190.)

die spezifische Drehung fest, da bei der Größe der Drehung des Cystins die Untersuchung im polarisierten Licht die genaueste Garantie für die Reinheit des Präparates bot.

0,2126 g Cystin wurden mit verdünnter Salzsäure (vom spez. Gew. 1,050 bei $25\frac{1}{2}^0$) zu 20 ccm gelöst. Der Ablenkungswinkel betrug im Mittel von 4 Bestimmungen — 4,77°. Die Temperatur während der Ablesung war 10,5°. Hieraus berechnet sich:

$$\alpha_D^{10,5} = -224{,}4.$$

Die ermittelte spezifische Drehung steht in völliger Übereinstimmung mit den früher gefundenen Werten und zeigt, daß das Präparat rein ist.

Der Konstitutionsbeweis für das benutzte Cystinpräparat wurde durch Überführung in Cysteïnsäure[1]) erbracht, für die die Konstitution einer α-Amino-β-Sulfopropionsäure erwiesen ist.

3 g Cystin werden in 100 ccm Wasser suspendiert und mit Brom oxydiert. Die eingedampfte Reaktionsflüssigkeit wird zur Verjagung des Bromwasserstoffs wiederholt mit Wasser abgedampft und der kristallinische Rückstand in das schwerlösliche Kupfersalz übergeführt. Aus dem Kupfersalz wurden 3,25 g Cysteïnsäure erhalten.

Die Substanz zersetzt sich bei 260 bis 262° unter starkem Aufblähen. (Der Zersetzungspunkt der Cysteïnsäure wurde früher von dem einen von uns zu 260° gefunden.) Sie gibt, wie aus der Darstellung ersichtlich ist, dasselbe schwerlösliche Kupfersalz wie die Cysteïnsäure; sie enthält ebenfalls ein Molekül Kristallwasser, und zeigt die gleiche spezifische Drehung wie die Cysteïnsäure.

0,2383 g Substanz gaben bei 110° 0,0225 g H_2O, entsprechend 9,44 Proz. H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NSO_5 + H_2O$:	Gefunden:
H_2O . . . . . 9,62 Proz.	9,44 Proz.

1,9915 g Substanz wurden mit Wasser zu 20 ccm gelöst und im Zweidecimeterrohr polarisiert. Im Mittel von 8 Bestimmungen wurde der Ablenkungswinkel + 1,53° beobachtet. Hieraus berechnet sich:

$$\alpha_D = +7{,}68^0.$$

Früher wurde gefunden:

$$\alpha_D = +7{,}46^0.$$

Die erhaltene Substanz ist nach den mitgeteilten Daten identisch mit der Cysteïnsäure (α-Amino-β-Sulfopropionsäure).

Die Ausbeute an reiner Cysteïnsäure aus dem verarbeiteten Cysteïnpräparat betrug 87,8 Proz. Es haben sich also 12,2 Proz. des Präparates der direkten Konstitutionsbestimmung entzogen.

[1]) Diese Beiträge 3, 25.

Um dem Einwand zu begegnen, daß diese 12,2 Proz. einem strukturisomeren Cystin entsprächen, wurden 8,2 g desselben Präparates in bekannter Weise in die Dichlordithiodilaktylsäure übergeführt und letztere mit Zinn und Salzsäure zur Thiomilchsäure reduziert. Das Ätherextrakt der durch Schwefelwasserstoff vom Zinn und durch Kohlensäure vom Schwefelwasserstoff befreiten Flüssigkeit enthielt ausschließlich β-Thiomilchsäure: Mit Eisenchlorid gab das eingedampfte und mit Wasser aufgenommene Ätherextrakt die charakteristische, rasch verschwindende Blaufärbung, mit Kupfersulfat wurde ein gelber Niederschlag erhalten. Es konnte mit letzterem Reagens auch nicht die Spur einer Violettfärbung bei Einhaltung der von Mörner zur Ausführung dieser Reaktion gegebenen Vorsichtsmaßregeln beobachtet werden. Die Gegenwart von α-Thiomilchsäure war also ausgeschlossen.

Die mitgeteilten Versuche beweisen, daß das untersuchte Cystinpräparat einheitliches Eiweißcystin war, d. h. das Disulfid der α-Amino-β-Thiomilchsäure.

Dieses einheitliche Präparat gab, nach Mörner behandelt, α-Thiomilchsäure.

6,5 g Cysteïnchlorhydrat wurden in 400 ccm Wasser gelöst und die Lösung im Autoklaven $1^1/_2$ Stunden auf 145° erwärmt. (Das zur Lösung benutzte Wasser wie das zur Füllung des Autoklaven verwendete war durch Kochen von Kohlensäure befreit.) Beim Öffnen des Apparates war kein Druck in demselben. Beim Ansaugen der Luft des Apparates entstand in einer vorgelegten Barytlösung ein Niederschlag von Baryumkarbonat. Es war also Kohlensäure abgespalten worden. Eine Probe der herausgenommenen Flüssigkeit entwickelte beim Kochen Schwefelwasserstoff. Die Flüssigkeit wurde mit Zinn und Salzsäure nach Zusatz einiger Tropfen Platinchloridlösung auf dem Wasserbade 4 Stunden reduziert, nach Entfernung des Zinns mit Schwefelwasserstoff ausgeäthert, und der nach Abdestillieren des Äthers hinterbleibende Rückstand in Wasser gelöst. (Dabei blieb ein auch von Mörner beobachtetes Produkt von Salbenkonsistenz ungelöst.) Diese wässerige Lösung gab intensive α-Thiomilchsäurereaktionen: mit Eisenchlorid wurde rasch verschwindende Blaufärbung, mit Kupfersulfat beständige Violettfärbung erhalten.

Die α-Thiomilchsäure wurde in bekannter Weise als Benzyl-α-Thiomilchsäure isoliert. Ausbeute: 0,4 g Benzyl-α-Thiomilchsäure vom Schmelzp. $76^1/_2$°, entsprechend 4,6 Proz. der Theorie.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,0873 g Substanz gaben:

0,1969 g CO_2,	entsprechend	61,51 Proz.	C
0,0507 g H_2O,	„	6,45 „	H.

Berechnet für $C_{10}H_{12}O_2S$:		Gefunden:
C	61,16 Proz.	61,51 Proz.
H	6,18 „	6,45 „

Der Versuch wurde zweimal mit dem gleichen Erfolge wiederholt.

Die Bildung von α-Thiomilchsäure aus dem Disulfid der α-Amino-β-Thiolaktylsäure wäre leicht verständlich, wenn man annähme, daß bei den Reaktionen, die von dieser zu jener führen, intermediär Brenztraubensäure gebildet würde. Da diese mit Schwefelwasserstoff ein Produkt liefert, das bei der Reduktion leicht in α-Thiomilchsäure übergeht[1]), würde das Auftreten von α-Thiomilchsäure verständlich werden. Auch die Bildung des r-Alanins könnte sich über Brenztraubensäure vollziehen, da Brenztraubensäure mit Ammoniak, wie de Jong[2]) gezeigt hat, unter Kohlensäureabspaltung und Umlagerung Acetylalanin liefert. Nun haben wir zwar Kohlensäure unter den Reaktionsprodukten nachweisen können, jedoch sind sämtliche Versuche zur Isolierung von Essigsäure, die, wenn obige Deutung zutreffen würde, nachzuweisen sein müßte, fehlgeschlagen, so daß die Aufklärung des in Frage kommenden Reaktionsverlaufs[3]) weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben muß.

Der Nachweis, daß auch die α-Thiomilchsäure sich aus Eiweißcystin (α-Diamino-β-Dithiodilaktylsäure) ableitet, macht die Annahme eines dem Eiweißcystin strukturisomeren Cystins als Muttersubstanz der α-Thiomilchsäure überflüssig. Diese Feststellung ist für die Struktur der cystingebenden Gruppe der Proteïnsubstanzen insofern von Wichtigkeit, als sie den Schluß gestattet, daß die beiden Schwefelatome[4]), die dieser Gruppe entsprechen, gleichartig gebunden sind, und somit der von Baumann vergeblich gesuchten einheitlichen Auffassung der den locker gebundenen Schwefel enthaltenden Eiweißabkömmlinge eine feste Unterlage gibt.

---

[1]) Liebigs Ann. 188, 130, Journ. f. prakt. Chem. 29, 366.

[2]) A. W. K. de Jong, Inwerking von Brandigdruivenzuur on Brandigdruivenzuurammonium. Dissert. Utrecht 1900.

[3]) Eine Deutung des Reaktionsverlaufs findet sich bei Gabriel, Berl. Ber. 38, 631, Anm. 2.

[4]) K. A. H. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 287.

XIX.

Über die Ausscheidung optisch aktiver Aminosäuren durch den Harn.

Von Dr. **Emil Reiss**,

z. Z. Assistenzarzt am städtischen Elisabeth-Krankenhause zu Aachen.

Aus dem städtischen Krankenhause zu Frankfurt a. M. (Oberarzt Prof. Dr. C. von Noorden).

Während früher im normalen Harn Aminosäuren nur in Spuren vorgefunden wurden, gelang Embden und Reese[1]) mit Hilfe einer Modifikation der Fischer-Bergellschen Naphthalinsulfochloridmethode der Nachweis ganz erheblicher Mengen von Glykokoll im normalen Harn. Daraus ergab sich die Aufgabe, mit der verbesserten Methodik zu untersuchen, wie sich der Organismus zu verfütterten Aminosäuren verhält. Für das inaktive Alanin wurde diese Frage von Plaut und Reese[2]) bereits dahin beantwortet, daß bei seiner Verfütterung an Menschen und Hunde auch in geringen Mengen stets Alanin in den Harn übergeht. Die ausgeschiedene Alaninverbindung drehte die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts, war also die Verbindung des l-Alanins. Hierdurch war festgestellt, daß die stereochemische Struktur der Aminosäuren, wie sie in ihrem optischen Verhalten zum Ausdruck kommt, für ihr Schicksal im Tierkörper von großer Wichtigkeit ist.

Eine weitere Klärung mußten diese Verhältnisse durch Verfütterung der im Tierkörper vorkommenden optisch aktiven Aminosäuren erfahren. Die auf Veranlassung von Dr. G. Embden vorgenommenen Untersuchungen des Verfassers stellten sich daher die Aufgabe, das Schicksal von verfüttertem l-Tyrosin, d-Leucin und d-Alanin zu verfolgen. Längere Zeit, nachdem diese Untersuchungen, die von Mai bis Juli 1905 angestellt wurden, beendet

---

[1]) Diese Beiträge 7, 411.

[2]) Ebenda 7, 425.

waren, kam dem Verfasser eine bereits am 17. Juni 1905 erschienene vorläufige Mitteilung von Wohlgemuth[1]) zur Kenntnis, in der dieser Autor auf Grund von Fütterungsversuchen an Kaninchen mit verschiedenen inaktiven Aminosäuren zu ähnlichen Resultaten gelangte, wie sie bereits früher für das inaktive Alanin von Plaut und Reese gewonnen waren.

Meine Versuche wurden am Hund und am Menschen vorgenommen. Die Präparate wurden mit der Nahrung verabreicht. Der benutzte Hund wurde stets erst in Stickstoffgleichgewicht gebracht und die 24stündige Harnmenge außer am Versuchstage noch an einigen voraufgehenden und folgenden Tagen auf Aminosäuren verarbeitet. Beim normalen Menschen war eine solche Anordnung zu umständlich. Hier wurde der in den ersten 6 Stunden nach der Aminosäuredarreichung sezernierte Harn getrennt von dem späteren verarbeitet. Es war nach den Erfahrungen von Plaut und Reese[2]) anzunehmen, daß die erste Urinportion die Hauptmenge der nach der Fütterung etwa ausgeschiedenen Aminosäuren enthalten würde. Ferner gaben auch die aus den Untersuchungen von Embden und Reese[3]) bekannten Ziffern für die vom Menschen ohne voraufgegangene Fütterung ausgeschiedenen Aminosäuremengen ein gewisses Vergleichsmaß.

Bezüglich der chemischen Methodik sei auf die eingehende Darstellung von Embden und Reese verwiesen.

Es wurde durchweg nach den letzten in dieser Publikation beschriebenen Modifikationen gearbeitet. Insbesondere wurde so lange mit Naphthalinsulfochlorid ausgeschüttelt, bis beim nachfolgenden Ansäuern keine nennenswerte Trübung (durch Naphthalinsulfoaminosäuren) mehr auftrat. Dieser praktisch als das Ende der Reaktion zu bezeichnende Punkt war meist nach zwei- bis dreimaligem, je 2 Tage währendem Schütteln erreicht. Ferner wurde besonderer Wert auf die völlige Befreiung des endlichen Reaktionsproduktes von dem Amid der Naphthalinsulfosäure gelegt. Die in dieser Weise ausgeführte Methode darf insoweit quantitativ genannt werden, als sie unter sich vergleichbare Werte liefert.

Der zu den Versuchen benutzte Hund, ein junges weibliches Tier, wurde zwecks sicherer Vornahme des Katheterismus am 11. Mai 1905 kolpotomiert. Der Urin wurde im Käfig gewöhnlich von Mittag bis Mittag gesammelt, filtriert und ein aliquoter Teil zur Bestimmung benutzt. Der Hund hatte immer normalen Stuhl, so daß hierdurch keine Verunreinigung bedingt war. Die Aminosäuren wurden mit der Nahrung verfüttert. Das Tier wurde nach der Fütterung mehrere Stunden bewacht. Niemals trat Erbrechen ein.

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 38, 2064 (1905).
[2]) loc. cit.
[3]) loc. cit.

1. l-Tyrosin.

Das Tyrosin wurde aus käuflichem Kaseïn durch Spalten mit Salzsäure in bekannter Weise hergestellt. Durch mehrmaliges Lösen des Rohproduktes in siedendem Wasser unter Zusatz von Salzsäure, Kochen mit etwas Tierkohle und heißes Filtrieren wurde das Tyrosin beim Erkaltenlassen völlig rein erhalten.

Versuch 1.

Hund erhält nach Einstellung des Stickstoffgleichgewichtes am 22. Mai 1905 6 g Tyrosin mit der Nahrung. Es wurden an 4 Tagen die durch den Harn ausgeschiedenen Aminosäuren bestimmt.

Datum	24 stündige Harnmenge in ccm	g N	Körpergewicht in kg	Naphthalinsulfoaminosäuren in g	Bemerkungen
17. bis 18. V. 1905	800	9,5	4,47	—	
18. „ 19. „ „	1025	10,4	—	—	
19. „ 20. „ „	960	10,9	4,45	—	
20. „ 21. „ „	650	9,2	—	0,1578	
21. „ 22. „ „	1025	10,3	4,45	0,1413	
22. „ 23. „ „	650	9,9	—	0,5166	Am 22. V. um
23. „ 24. „ „	860	10,5	4,50	0,2516	$2^1/_2$ Uhr
24. „ 25. „ „	965	11,8	—	—	nachm. 6 g
25. „ 26. „ „	965	10,4	4,50	—	Tyrosin.
26. „ 27. „ „	770	10,1	4,42	—	

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß an dem Tyrosintage das Drei- bis Vierfache der an den vorangegangenen Tagen ausgeschiedenen Menge Aminosäurenverbindung im Harn aufgefunden wurde. Auch an dem der Tyrosindarreichung folgenden Tage war die Aminosäurenausscheidung noch etwas höher als vorher. Die Tatsache, daß der normale Hund Aminosäuren oder ähnliche Verbindungen in nicht unerheblicher Menge ausscheidet, wurde hier zum ersten Male festgestellt.

Schwerer zu entscheiden war die Frage, ob das nach der Tyrosinfütterung ausgeschiedene Plus an Aminosäuren Tyrosin war. Dafür sprach die Millonsche Reaktion des Harns, die an dem Tage der Tyrosindarreichung und an dem darauffolgenden Tage erheblich stärker ausfiel als sonst, übrigens aber an allen Tagen schon in der Kälte auftrat. Zur sicheren Entscheidung der Frage wurde versucht, das Tyrosin aus seiner Naphthalinsulfoverbindung zu isolieren.

Zu dem Zwecke wurde das am 22. bis 23. Mai 1905 erhaltene Reaktionsprodukt mit mehr als der 10fachen Menge konzentrierter Salzsäure im

Schießrohr bei 110—115° (Ölbad) 6 Stunden erhitzt. Doch ließen sich nach Eindampfen der filtrierten Flüssigkeit bei nicht über 50°, Auflösen in Wasser usw. keine Tyrosinkristalle gewinnen. Dagegen zeigte die Lösung deutliche, durch Ätherbehandlung nicht entfernbare, Millonsche Reaktion.

Es ist also auf diesem Wege die Identifizierung des Tyrosins nicht mit Sicherheit gelungen, wenn auch aus dem mitgeteilten Versuche mit großer Wahrscheinlichkeit (Erhöhung der Gesamtausscheidung, Millonsche Reaktion des Harns und des Spaltungsproduktes) hervorgeht, daß ein — allerdings unerheblicher — Teil des verfütterten Tyrosins unzersetzt den Körper passiert hat und im Harn ausgeschieden wurde, was mit früheren Versuchen, insbesondere mit den von Blendermann[1]) am Kaninchen ausgeführten, übereinstimmen würde.

Versuch 2.

Ein zweiter Tyrosinfütterungsversuch wird am Menschen gemacht.

Versuchsperson: Der Verfasser. Am 11. Juli 1905 vormittags (2 Stunden vorher 1 Tasse Kakao, 1 Brötchen mit Butter) werden 10 g Tyrosin (aus Kaseïn) mit etwas Mineralwasser genommen. Der Urin der ersten 6 Stunden, dann der Urin der folgenden $19^1/_2$ Stunden werden getrennt untersucht.

	Harnmenge in ccm	Naphthalinsulfo-aminosäuren in g	Dasselbe berechnet auf Ausscheidung pro 1 Std.
1. Harnportion . .	330	0,1342	0,0224
2. Harnportion . .	670	0,8524	0,0437
Summa .	1000	0,9866	—

Das aus der 1. Urinportion erhaltene Reaktionsprodukt, in Alkohol gelöst, beeinflußte die Ebene des polarisierten Lichtes nicht. Das aus der 2. Urinportion erhaltene Reaktionsprodukt wurde, wie im Versuch 1. beschrieben, zu spalten gesucht. Zwar schied sich im Schießrohr die Naphthalinsulfosäure gut ab, aber der Rest, in üblicher Weise behandelt, zeigte keine durch Ätherextraktion nicht entfernbare Millonsche Reaktion. Auch konnten keine Tyrosinkristalle erhalten werden.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß in den ersten 6 Stunden nach der Tyrosinaufnahme erheblich weniger Aminosäuren ausgeschieden wurden, als in den folgenden $19^1/_2$ Stunden. Auch wenn man die erhaltenen Zahlen auf die Stunde berechnet, enthielt die 1. Urinportion nur etwa die Häfte der mit der 2. Urinportion sezernierten Aminosäuren (vgl. die letzte Kolumne der Tabelle). Die Gesamtaminosäurenausscheidung war nicht höher als die von anderen Autoren mit der gleichen Methode ohne Tyrosindarreichung beim Menschen gefundene. Ferner fiel die Millonsche Reaktion

[1]) Blendermann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 324.

in dem Spaltungsprodukt negativ aus. Alles das deutet darauf hin, daß keine in Betracht kommende Ausscheidung des aufgenommenen Tyrosins stattgefunden hat.

Vergleicht man den am Hunde mit dem am Menschen vorgenommenen Fütterungsversuch, so ist man versucht, zu schließen, daß der betreffende menschliche Organismus eine größere Toleranz für optisch aktives Tyrosin hatte, als der benutzte Hund. Das wäre deshalb besonders interessant, weil nach Plaut und Reese der Mensch optisch inaktives Alanin schlechter als der Hund verarbeitet. Doch ist zu bemerken, daß in meinen Versuchen die aufgenommene Tyrosinmenge auf Kilogramm Körpergewicht berechnet beim Hund ein Vielfaches von der beim Menschen war. Mit Sicherheit geht also aus meinen Versuchen nur hervor, daß die Toleranz des Hundes für Tyrosin keine unbegrenzte ist, während die Assimilationsgrenze des Menschen bisher nicht überschritten wurde, daß aber im ganzen Mensch wie Hund sehr erhebliche Mengen des optisch aktiven Tyrosins zu assimilieren vermögen.

2. d-Leucin.

Das Leucin wurde aus Kaseïn durch weitere Einengung der nach Entfernung des Tyrosins verbliebenen Flüssigkeit erhalten. Durch mehrmaliges Umkristallisieren und Reinigen mit Tierkohle wurde es zu einer solchen Reinheit gebracht, daß es glänzend silberweiße Schuppen darstellte, unter dem Mikroskop in Wasser ausschließlich die bekannten Kugelformen zeigte und eine schwerlösliche Kupferverbindung bildete.

Versuch 3.

Hund (der gleiche wie in Versuch 1) erhält nach Einstellung des Stickstoffgleichgewichtes am 15. Juni 1905 6 g Leucin mit der Nahrung. Es werden an 4 Tagen die durch den Harn ausgeschiedenen Aminosäuren bestimmt.

Datum	24 stündige Harnmenge in ccm	g N	Körpergewicht in kg	Naphthalinsulfoaminosäuren in g	Bemerkungen
10. bis 11. VI. 1905	700	10,0	5,07	—	
11. „ 12. „ „	795	9,4	—	—	
12. „ 13. „ „	795	9,4	5,04	—	
13. „ 14. „ „	780	9,5	—	0,2689	
14. „ 15. „ „	820	10,4	—	0,2795	
15. „ 16. „ „	945	10,8	5,05	0,2097	Am 15. VI. um 3 Uhr nachm. 6 g Leucin.
16. „ 17. „ „	310	4,0	—	0,1206	Am 16. VI. bis abends kein Harn.
17. „ 18. „ „	550	6,6	—	—	
18. „ 19. „ „	550	6,6	4,75	—	

Die Ausscheidungsverhältnisse zeigen, daß keine in Betracht kommenden Mengen Leucin unverändert den Körper passiert haben. Die Anurie des Hundes nach der Leucindarreichung, die N-Retention und die Gewichtsabnahme deuten auf eine Giftwirkung des Leucins, zeigen aber auch gleichzeitig, daß dieses — mindestens teilweise — resorbiert wurde. Der Hund befand sich im übrigen wohl und wies später wieder normale Harnmengen auf.

Die Versuche 1 und 3 lehren, daß bei einem und demselben Tiere die Assimilationsfähigkeit für verschiedene Aminosäuren eine verschiedene sein kann. Bei unserem Tiere war sie bei Verabreichung gleicher Gewichtsmengen für Leucin größer als für Tyrosin. Das stimmt auch einigermaßen mit den Erfahrungen überein, die Stolte[1]) mit der intravenösen Einverleibung dieser Substanzen beim Kaninchen gemacht hat. Ferner zeigen die Versuche, daß die Mengen der normalerweise täglich ausgeschiedenen Aminosäuren auch beim Hunde wenigstens in der gleichen Größenordnung liegen.

3. d-Alanin.

Ein besonderes Interesse beanspruchten Fütterungsversuche mit d-Alanin, der im Körper selbst vorkommenden optisch aktiven Modifikation dieser Aminosäure, deshalb, weil Versuche mit racemischem Alanin bereits vorlagen. Plaut und Reese hatten gefunden, daß die nach Verabreichung von inaktivem Alanin aus dem Harn erhaltenen Produkte stark rechts drehten, während die Reaktionsprodukte aus normalem Harn gar nicht oder schwach nach links drehten. Aus verfüttertem r-Alanin wurde demnach l-Alanin abgespalten und ausgeschieden. Wie verhält sich nun das d-Alanin im Körper?

Das d-Alanin wurde aus degommierter Seide nach E. Fischers Veresterungsmethode dargestellt.

Versuch 4.

Versuchsperson: Der Verfasser. Am 20. Juli 1905 vormittags (2 Stunden vorher eine Tasse Kakao, 1 Brötchen) werden 8 g d-Alanin mit etwas Mineralwasser genommen. Der Urin der ersten 6 und der folgenden 18 Stunden wird getrennt verarbeitet.

---

[1]) Diese Beiträge 5, 15.

	Harnmenge in ccm	Naphthalinsulfo-aminosäuren in g	Dasselbe berechnet auf Ausscheidung pro 1 Std.
1. Harnportion . .	360	0,4055	0,0676
2. Harnportion . .	820	1,1316	0,0629
Summe .	1180	1,5371	—

Der Versuch zeigt, daß erhebliche Mengen von d-Alanin sicher nicht ausgeschieden wurden, während Plaut und Reese nach Verabreichung von 11 g r-Alanin 5,2 g der Naphthalinsulfoverbindung im Urin der ersten 6 Stunden wiederfanden. In unserem Versuche wurden mit der ersten Urinportion pro Stunde nur unerheblich mehr Aminosäuren ausgeschieden als mit der zweiten. Das Reaktionsprodukt drehte etwas nach rechts, in der ersten Portion stärker als in der zweiten. Diese Ergebnisse erklären sich am ungezwungensten durch die Annahme, daß unser Alanin zu geringem Teile racemisiert war. Leider konnte das nachträglich nicht mehr festgestellt werden. Das eingeführte d-Alanin wurde völlig verbrannt, der Razemkörper gespalten, sein d-Anteil ebenfalls anscheinend völlig verbrannt und der l-Anteil, wenigstens zum Teil, ausgeschieden.

Jedenfalls geht aus dem Versuche hervor, daß der Organismus d-Alanin weit vollständiger als r-Alanin verarbeitet. Durch die Versuche mit aktivem Tyrosin und Leucin ist ferner gezeigt worden, daß der Organismus die natürlich vorkommenden aktiven Modifikationen dieser Stoffe sehr vollständig verbrennt. Es stimmen also diese Resultate sehr gut mit den von Plaut und Reese und von Wohlgemuth mit inaktiven Aminosäuren angestellten Versuchen überein. Aus der Gesamtheit all dieser Versuche läßt sich der Schluß ziehen, daß die im Körper selbst vorkommenden aktiven Aminosäuren weit besser verbrannt werden, als die entsprechenden Razemkörper, bzw. ihre aus den letzteren im Organismus abgespaltenen unnatürlichen Spiegelbildisomeren.

XX.

Über die Einwirkung des Labferments auf Kaseïn*).

Von Dr. **Eugen Petry**, klin. Assistent.

Aus der Grazer medizin. Klinik, Vorstand Prof. Lorenz.

Die grundlegenden Untersuchungen Olof Hammarstens[1]) haben uns nicht nur die Erkenntnis vermittelt, daß die Labgerinnung eine Fermentwirkung sei, sondern sie zeigten auch, daß der Gerinnungsvorgang nicht das wesentliche an der Labwirkung, sondern nur eine von der gleichzeitigen Anwesenheit von Kalksalzen abhängige Erscheinung ist, während die wesentliche Wirkung dieses Ferments, die Umwandlung des Kaseïns in Parakaseïn (eine durch die Kalkfällbarkeit und andere chemische und physikalische Unterschiede vom Kaseïn verschiedene Modifikation des letzteren) auch ohne Anwesenheit von Kalksalzen vor sich geht.

Von großer Bedeutung für die Auffassung dieses Umwandlungsvorganges war der Umstand, daß Hammarsten als Produkt der Labwirkung neben dem Parakaseïn eine geringe Menge einer Albumose fand, die er Molkeneiweiß nannte. Die nächstliegende Annahme war die, daß die Labwirkung einer Spaltung des Kaseïnmoleküls in das Parakaseïn und in Molkeneiweiß entspreche. Man rechnete daher das Labferment den proteolytischen Fermenten zu. Je eingehender sich aber unsere Kenntnisse über die chemische Leistung und die Wirkungsweise dieser letzteren gestalteten, desto gezwungener reihte sich ihnen das Labferment an.

Zunächst ist die chemische Wirkung dieses Ferments: die Abtrennung einer nur in verschwindender Menge nachweisbaren

---

*) Eine vorläufige Mitteilung der hier ausführlich wiedergegebenen Resultate erschien in der Wiener klin. Wochenschrift 1906, Nr. 6.

Albumose vom Kaseïnmolekül, bei der also zwei so vollkommen ungleichwertige Bruchstücke entstehen, scheinbar ohne Analogie unter den proteolytischen Fermenten, da diese bei längerer Einwirkung zumeist zur Zersplitterung des Moleküls unter Bildung annähernd gleichwertiger Bruchstücke führen.

Noch auffallender unterscheidet sich das Labferment von den proteolytischen Fermenten durch die Gesetze seiner Wirksamkeit, so z. B. durch den Einfluß der Konzentration auf die Wirkung: während diese bei der Milchgerinnung der Konzentration einfach parallel geht, ist sie bei den spaltenden Fermenten der Quadratwurzel aus der Konzentration proportional*). Das Labferment zeigt sich ferner im Gegensatz zu den bekannten proteolytischen Fermenten auch bei sehr niedrigen Temperaturen wirksam.

Weiterhin vermißte Fuld[2]) beim Labferment den verzögernden Einfluß der Reaktionsprodukte auf die Umwandlungsgeschwindigkeit.

Auf Grund derartiger Erwägungen kam insbesondere Fuld dazu, in der Parakaseïnbildung eine nicht durch Spaltung bedingte Veränderung des Kaseïns zu erblicken. Tatsächlich kann die Menge des entstehenden „Molkeneiweißes" nur eine minimale sein, da Hillmann[3]) bis zu 97 Proz. des verwendeten Kaseïns als Käse wiederfinden konnte. Auf Grund dieser Beobachtung hatte auch Hammarsten[4]) (bereits vor Fuld) die Möglichkeit zugegeben, daß es sich bei der Gerinnung „nicht um eine hydrolytische Spaltung, sondern um eine intramolekulare Umlagerung oder eine andere noch unbekannte Umwandlung des Kaseïns handle". Loevenhart[5]), der sich dieser Auffassung anschloß, kam auf Grund des chemischen und physikalischen Verhaltens des Parakaseïns zu der Ansicht, letzteres sei ein höher molekularer Körper als das Parakaseïn, eine Auffassung, die Laqueur[6]) in jüngster Zeit durch exakte Untersuchung des physikalisch-chemischen Verhaltens beider Substanzen, deren Resultate er auf der Meraner Naturforscherversammlung (1905) mitteilte, zurückweisen konnte. Zur Erklärung des Hammarstenschen Befundes von „Molkeneiweiß" waren die Autoren geneigt, das Mitspielen bakterieller Prozesse (Fuld) anzunehmen; Hammarsten selbst dachte daran, daß es sich um der Gerinnung entgangene Reste von Parakaseïn handeln könnte.

*) Vgl. dagegen Anmerkung S. 352.

Im Verlaufe einer andere Zwecke verfolgenden Untersuchung machte ich eine Beobachtung, deren naturgemäße weitere Verfolgung zu einer Reihe von Tatsachen führte, welche geeignet erscheinen, Fulds Zweifel an der einheitlichen Ursache der Parakaseïn- und der Molkeneiweißbildung in hohem Maße zu unterstützen.

Gelegentlich einer Untersuchung über die Fällungsgrenzen des Parakaseïns gegen Ammonsulfat konnte ich feststellen, daß das Verhalten einer kalkfreien Kaseïn-Labmischung bei fraktionierter Salzfällung im Verlaufe einer mehrere Stunden dauernden Digestion nicht konstant bleibt, sondern daß sich die Fällungsgrenzen auch nach der Bildung von Parakaseïn noch langsam, aber stetig ändern. So rückt z. B. die untere Fällungsgrenze zunehmend hinab, die Mischung beginnt bei zunehmend geringerem Salzgehalt sich zu trüben.

Noch befremdender war der Umstand, daß solche längere Zeit digerierte Proben mit Chlorcalcium nicht mehr so leicht wie zu Beginn der Digestion gefällt werden konnten, ja bei entsprechend lange fortgesetzter Digestion verschwand die Fällbarkeit durch Kalkzusatz vollkommen.

All dies wies darauf hin, daß das Labferment bei Abwesenheit von Kalksalzen auf Kaseïn eine über die Bildung des als Parakaseïn bekannten Kaseïnderivates hinausgehende Wirksamkeit entfaltet, über welche ich in der mir vorliegenden Literatur keinerlei Angaben vorfinden konnte.

Ich sah mich daher veranlaßt, die Einwirkung des Labferments auf kalkfreies Kaseïn auch in ihren weiteren Stadien systematisch zu verfolgen und dabei diese bisher nicht gekannte Fermentwirkung nach den Gesichtspunkten, die wir den grundlegenden Untersuchungen aus dem Laboratorium F. Hofmeisters verdanken, chemisch zu charakterisieren und einiges über die Bedingungen ihrer Wirksamkeit festzustellen.

Bezüglich der Versuchstechnik muß ich anführen, daß ich nur Mercksche Labextrakte 1 : 10000 benutzte und nur solche (direkt bezogene) Präparate verwendete, die von saurer Reaktion, vollkommen klar und frei von fauligem Geruch waren. Wo nicht ausdrücklich ein anderes Kaseïnpräparat angegeben, verwendete ich von Merck bezogenes Caseïnum Hammarsten, welches ich durch Verreiben mit Wasser unter tropfenweisem Zusatz von 1proz. Natriumkarbonatlösung in Lösung (sie reagierte regelmäßig noch etwas sauer) brachte. Die Lösung wurde durch die Zentrifuge vom ungelösten Rest getrennt. Stets verwendete ich nur frisch bereitete Kaseïnlösungen.

Die meisten Versuche führte ich bei Zimmertemperatur aus, da bei höheren Temperaturen stets störende Gerinnungen zu beobachten waren.

Als Antiseptica verwandte ich teils Toluol, teils Senföl, bei quantitativen Versuchen ausschließlich ersteres.

1. Chemische Charakterisierung der bei der Labgerinnung entstehenden Spaltungsprodukte.

Die erwähnte Beobachtung ließ sich zunächst am ehesten im Sinne eines stetigen Fortschreitens der zur Parakaseïnbildung führenden Umwandlung des Kaseïns deuten. Um darüber eine Entscheidung zu gewinnen, schien es vor allem notwendig, festzustellen, ob im weiteren Verlaufe der Labwirkung die Menge des Molkeneiweißes auf Kosten des Kaseïns eine Vermehrung erfährt. Da sowohl Kaseïn als Parakaseïn durch jene Salzkonzentrationen, welche Globuline zu fällen vermögen (konzentrierte Kochsalzlösung, konzentrierte Magnesiumsulfatlösung, halbgesättigte Ammon- und Zinksulfatlösung), sich aus den Lösungen vollkommen abscheiden lassen, so bediente ich mich zunächst dieser Methode, um das Kaseïn wenigstens von einem Teile des „Molkeneiweißes" zu trennen. Ich beachtete somit das Verhalten der nach Abscheidung des Kaseïns durch Halbsättigung mit Ammonsulfat noch in Lösung bleibenden Fraktion bei länger dauernder Labwirkung.

Der Kürze halber nenne ich diese vom Kaseïnrest gut abtrennbare Fraktion, welche nur die sogenannten sekundären Albumosen des Molkeneiweißes enthält, hier stets kurzweg Molkeneiweißfraktion.

Ich entfernte zunächst in einem Vorversuche in zu verschiedenen Zeiten einer Eukasin-Labmischung entnommenen Proben das Parakaseïn durch Halbsättigung mit Ammonsulfat und sättigte die Filtrate durch Eintragen von gepulvertem Ammonsulfat. Dabei konnte ich feststellen, daß die dadurch entstehende Fällung nach $2^1/_2$ Stunden eine ganz leichte Trübung darstellte, nach sechsstündiger Einwirkung jedoch bereits einen kompakten Niederschlag bildete.

Im Anschluß daran suchte ich in zwei Versuchen die Zunahme der Molkeneiweißfraktion auch durch quantitative Bestimmungen festzustellen, indem ich einem Labverdauungsgemische zu verschiedenen Zeiten Proben entnahm, behufs Entfernung des Parakaseïns mit Magnesiumsulfat (in Substanz) sättigte und den Stickstoffgehalt der Filtrate ermittelte.

Versuch 1. 5 g Cas. Hammarsten in 140 ccm Wasser gelöst, werden mit 3,5 ccm Lablösung versetzt, mit Toluol bei 40° digeriert. Nach 5 Minuten, 1 Stunde, 5 Stunden, 24 und 48 Stunden werden Proben entnommen, mit Magnesiumsulfat gesättigt, und der Stickstoffgehalt des nach 24stündigem Stehen der Probe abfiltrierten Filtrates ermittelt.

Er betrug:

Nach 5 Minuten	0,049 Proz.
„ 1 Stunde	0,049 „
„ 5 Stunden	0,060 „
„ 24 „	0,063 „
„ 48 „	0,087 „

Versuch 2. 2,5 ccm Cas. Hammarsten in 170 ccm Wasser gelöst. Davon werden 140 ccm (zentrifugiert) mit 14 ccm Lablösung versetzt und bei 40° (mit Toluolzusatz) digeriert. Der Gehalt der zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben an nicht durch Magnesiumsulfat fällbarem Stickstoff betrug:

Nach 15 Minuten	0,08 Proz.
„ 3 Stunden	0,08 „
„ 7 „	0,095 „
„ 24 „	0,119 „
„ 48 „	0,130 „

Wie man sieht, findet bereits bei diesen geringen Labkonzentrationen eine merkliche Zunahme der Molkeneiweißfraktion statt. In einigen der weiter unten angeführten Versuche, welche mit stärkeren Konzentrationen angestellt sind, erscheint diese Abspaltung weitaus augenfälliger.

Es findet somit tatsächlich auch nach der Anbildung von Parakaseïn noch eine stetig fortschreitende weitere Veränderung in dem Labverdauungsgemisch statt: Die Molkeneiweißbildung bleibt nicht im Momente der Parakaseïnbildung stehen, sondern schreitet über diesen hinaus kontinuierlich weiter.

Um so wichtiger erschien es nunmehr, auch die Zusammensetzung jener Fraktion zu ermitteln, von der wir einen Teil des Molkeneiweißes durch Salzfällung getrennt haben: der die Hauptmasse darstellenden Fällung — ich will sie nach Analogie mit den Eiweißfraktionen des Blutserums die Globulinfraktion nennen — denn diese muß voraussichtlich das Kaseïn und seine nächsten Umwandlungsprodukte enthalten.

Vor allem prüfte ich das Verhalten derselben gegen Ammonsulfat, da bekanntlich das Parakaseïn sich in seinen Fällungsgrenzen vom Kaseïn unterscheidet (P. Th. Müller, Loevenhart, Laqueur).

Versuch 3. 5proz. Nutroselösung wurde mit gleichen Teilen Lablösung vermischt, die klare Mischung geteilt, eine Portion sofort untersucht, ein Teil derselben nach 24stündiger Digestion bei Zimmertemperatur (Senföl). Es wurde durch fraktionierte Zugabe von Ammonsulfat nach der von

E. P. Pick beschriebenen Versuchsanordnung die zum ersten Auftreten einer Fällung nötige Konzentration an diesem Salz ermittelt.

Tabelle I.

Ammonsulfat auf 10 ccm Gesamtvolumen ccm	Unmittelbar nach Ansetzen der Probe	Nach 48 stündiger Digestion
0,5	klar	klar
1	„	„
1,5	„	deutliche Trübung
2	Opaleszenz	Niederschlag
2,5	Niederschlag	„
3	dicker Niederschlag	„
3,5	„	„

Das deutliche Hinabrücken der Fällungsgrenze ist ein Beweis dafür, daß sich auch in der Globulinfraktion Umwandlungen vollzogen haben.

Prüft man an einer Kaseïn-Labmischung während des Fortschreitens der Fermentwirkung wiederholt das Verhalten gegen Chlorcalcium, so bemerkt man, wie bereits eingangs erwähnt, daß zu Beginn Chlorcalcium auch bei Zimmertemperatur eine momentane Fällung veranlaßt; nach einiger Zeit tritt diese Fällung nicht mehr so rasch auf, nach noch längerer Einwirkung des Ferments bleibt die Fällung überhaupt aus; Chlorcalcium vermag keinen Niederschlag mehr zu erzeugen. Prüft man dann das Verhalten gegen Erhitzen, so nimmt man wahr, daß auch die Fähigkeit des Parakaseïns, durch Siedehitze koaguliert zu werden (Metakaseïnreaktion von Roberts), verloren gegangen ist.

Diese Beobachtung, die ich wiederholt zu machen Gelegenheit hatte, läßt sich am einfachsten wohl dahin deuten, daß das Kaseïn durch die fortschreitende Labwirkung in Substanzen übergeführt wird, welche durch Chlorcalcium und Hitze nicht mehr fällbar sind. Doch mußte dabei auch erwogen werden, daß es Substanzen gibt, deren Anwesenheit das Ausfällen von Parakaseïncalcium hemmt, z. B. Kaseïn, und es wäre auch die Entstehung von solchen hemmenden Substanzen (z. B. Albumosen) durch die fortschreitende Labverdauung denkbar. Es ließ sich jedoch zeigen, daß diese Annahme zur Erklärung der Erscheinung nicht ausreicht.

Während die das Parakaseïn charakterisierenden Reaktionen durch die Labwirkung bald schwinden, bleibt die dem Kaseïn und Parakaseïn gemeinsame Fällbarkeit durch Essigsäure viel

länger erhalten. Auf diese Weise konnte ich das Umwandlungsprodukt des Parakaseïns von den übrigen Bestandteilen der Verdauungsmischung trennen, und neuerdings durch vorsichtigen Zusatz von Natriumcarbonat in Lösung bringen. Die so von den übrigen Bestandteilen der Mischung befreite Lösung zeigt bei entsprechend lange fortgeschrittener Verdauung das gleiche Verhalten wie die Mutterlauge; sie ist weder durch Hitze noch durch Kalkzusatz fällbar.

Versuch 4. Es wurden 4 g Kaseïn in 60 ccm Wasser gelöst und 80 ccm Labessenz zugesetzt. Nach 24stündiger Digestion bei Zimmertemperatur (Senföl) wurde abgekocht, vom Hitzekoagulat abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäure stark angesäuert, solange noch ein Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abfiltriert, wiederholt mit Wasser gewaschen und durch tropfenweisen Zusatz von Natriumcarbonat (1 Proz.) in Lösung gebracht.

Die saure, opalisierende Lösung war fällbar durch: Essigsäure, konzentrierte Kupfersulfatlösung, verdünnte Zinksulfatlösung, verdünnte Ferrosulfatlösung, durch Bleiacetat, Pikrinsäure, Tannin.

Sie konnte nicht gefällt werden durch: Sublimat, Jodquecksilberkalium, Chlorcalcium, Hitze. Auch Zusatz von Lab, Digestion bei 40° und nachträglicher Zusatz von Chlorcalcium fällte die Substanz nicht.

Durch konzentrierte Chlornatriumlösung wurde die Lösung (auch bei überschüssigem Zusatz) nicht getrübt. Absoluter Alkohol konnte im gleichen Volum zugesetzt werden, ohne daß Trübung eintrat. Erst bei 20 Volumteilen Alkohol auf 10 Teile Lösung begann leichte Trübung aufzutreten.

Die Biuretprobe sowie Millons Reaktion gab die Lösung sehr intensiv, die Xanthoproteïnprobe mäßig, Molischs Probe fiel negativ aus.

Es erscheint mir wichtig, hervorzuheben, daß ich bei anderen Darstellungen Präparate erhielt, welche zwar ebenfalls noch durch Essigsäure fällbar waren, aber bezüglich ihres Verhaltens zu Zinksalzen sich als noch weiter vom Parakaseïn abstehend erwiesen, als das eben beschriebene.

Versuch 5. 10 g Kaseïn in 800 ccm Wasser gelöst, 80 ccm Labessenz. Nach 48stündiger Digestion bei Zimmertemperatur wird mit Essigsäure angesäuert, solange noch ein Niederschlag entsteht. Derselbe wird abfiltriert, mit größeren Mengen Wasser gewaschen und durch tropfenweisen Zusatz von 1 proz. Sodalösung in Lösung gebracht. Die Flüssigkeit reagiert schwach sauer, fällt nicht beim Kochen, nicht beim Versetzen mit Chlorcalcium, läßt sich durch verdünnte Zinksulfatlösung, welche sowohl Kaseïn als Parakaseïn prompt fällt, nicht fällen. Essigsäure fällt die Substanz aus der Lösung.

Der Versuch, das Verhalten dieser Substanz gegen fraktionierte Salzfällung zu charakterisieren, mißlang infolge der starken Opaleszenz der Lösung. Ich konnte jedoch konstatieren, daß ein Salzzusatz, der genügt, um Parakaseïn abzuscheiden, bei dieser Substanz zur vollkommenen Abscheidung

nicht hinreicht. Erst bei einem Gehalt von 4,5 ccm Ammonsulfat auf zehn Gesamtvolum erzielte ich einen sich absetzenden Niederschlag und ein klares, bei weiterem Salzzusatz klar bleibendes Filtrat.

Ich hoffe über diesen Gegenstand sowie über die Charakterisierung dieser Substanz nach anderen Richtungen in Kurzem näheres berichten zu können.

Soweit reichen jedoch die hier mitgeteilten Daten hin, um in diesen Substanzen weitere Umwandlungsprodukte des Parakaseïns erblicken zu lassen, welche von demselben durch den Verlust der Fällbarkeit durch Hitze, durch Chlorcalcium (und eventuell auch durch Zinksalze) streng geschieden sind, und welche auch durch weitere Labeinwirkung nicht in Parakaseïn übergeführt werden können.

Andererseits glaube ich, daß die Fällbarkeit durch Essigsäure eine für das Kaseïn so charakteristische Eigenschaft ist, die nach Alexanders[7]) Untersuchungen von keiner der (peptischen) Albumosen des Kaseïns geteilt wird, daß es nicht wahrscheinlich erscheint, daß diese Substanz bereits den Albumosen zuzuzählen sei.

Sie muß vielmehr als eine neue Modifikation des Kaseïns angesprochen werden, welche von demselben vermutlich weiter absteht als das Parakaseïn und bei der weiteren Spaltung des letzteren durch das Labferment (siehe weiter unten) als Zwischenkörper entsteht.

Die Möglichkeit, diese Substanz aus dem Verdauungsgemische durch Essigsäurezusatz abzuscheiden, führte auch zur Beantwortung einer weiteren Frage: die Untersuchung des Filtrates von der Säurelösung mußte ergeben, ob dieses modifizierte Parakaseïn die einzige Substanz ist, welche der Globulinfraktion angehört, oder ob außer ihr noch andere Körper bei Halbsättigung mit Ammonsulfat abgeschieden werden. In der Tat gab in Versuch 4 das Filtrat von der Essigsäurefällung mit Ammonsulfat bei Halbsättigung einen dicken, reichlichen Niederschlag.

Über das Verhalten bei fraktionierter Salzfällung nach dem Vorgange von E. P. Pick gibt Tabelle II Aufschluß.

Wie man sieht, handelt es sich um eine Fraktion, deren Abscheidung bei 2 ccm Ammonsulfat auf 10 Gesamtvolumen beginnt und bei 4 ccm abgeschlossen ist.

Ich schied daher aus der Hauptmasse des Filtrates diese Fraktion durch Zugabe des gleichen Volumens konzentrierter Ammonsulfatlösung ab, brachte nach 24 Stunden den Niederschlag aufs Filter,

preßte ihn ab und löste in Wasser. Diese Lösung wurde auf ihr Verhalten gegen die wichtigsten Eiweißreagentien untersucht; Tabelle III enthält die Ergebnisse. In der dritten Rubrik der Tabelle fügte ich des Vergleiches halber die Reaktionen, welche die aus derselben Darstellung durch Ganzsättigung des zweiten Filtrates mit Ammonsulfat abgeschiedenen sekundären Albumosen gaben, bei.

Tabelle II.

Ammon-sulfat ccm	Wasser ccm	Verhalten der Probe	Verhalten des Filtrates bei Zusatz von 0,2 Ammonsulfat
1,5	6,5	klar	—
2	6	starke Opaleszenz	—
2,5	5,5	Niederschlag	Opaleszenz
3	5	stärkerer Niederschlag	„
3,5	4,5	„	„
4	4	dicke weiße Fällung	klar
4,5	3,5	„	„
5	3	„	„

Tabelle III.

Reagens	Niederschlag durch Halbsättigung („Primäre“ Albumosen)	Niederschlag durch Ganzsättigung („Sekundäre“ Albumosen)
HNO_3	leichte Trübung	keine Trübung
Essigs. u. Ferrocyankal.	sehr geringe Trübung	sehr geringe Trübung
$CuSO_4$, verdünnt	keine Trübung	keine Trübung
$ZnSO_4$, verdünnt	„ „	„ „
Sublimat	keine Fällung	„ „
Jodquecksilberkalium	dicker Niederschlag	starke Trübung
Pikrinsäure	mäßiger gelber Niederschl.	dicker Niederschlag
Tannin	voluminöse Fällung	starke Fällung
Xanthoproteïn	mäßige Gelbfärbung	starke Gelbfärbung
Molisch	Negativ	Negativ
Millon	Stark	Deutlich

Wie man sieht, stimmt die bei Halbsättigung abgeschiedene Fraktion in ihrem Verhalten in ziemlich weitgehender Weise mit den primären Albumosen, wie sie Alexander bei der peptischen Verdauung erhielt, überein.

Ich muß außerdem erwähnen, daß auch die isolierte Substanz in konzentrierter Lösung sich durch Säurezusatz nicht ausfällen ließ.

Die Abscheidung von Kaseïnderivaten durch Essigsäure ist sicherlich keine quantitative. Wenn die der Säurefällung entgangenen Mengen von mit Ammonsulfathalbsättigung fällbaren Substanzen nur unbedeutende wären, dürfte man ihre Anwesenheit zu keinen weitergehenden Schlüssen verwerten. Ihre Menge übertrifft jedoch bei vorgeschrittener Verdauung, z. B. bei Versuch 4, sicher jene der Essigsäurefällung. Da sie auch nach Reindarstellung und Konzentrierung nicht durch Säurezusatz abgeschieden werden können, so scheint es ausgeschlossen, daß es sich um Spuren von in Lösung gebliebenem Kaseïn handelt; ich glaube vielmehr, daß man sie als primäre Albumosen ansprechen muß.

Wie man sieht, bleibt die Labwirkung nicht bei der Bildung von Parakaseïn und einer Spur einer als Molkeneiweiß bekannten Albumose stehen, sondern es erfährt ersteres eine weitere Umwandlung in ein nicht mehr durch Kalk fällbares Kaseïnderivat und unterliegt zu einem sehr bedeutenden Anteile einer weiteren Aufspaltung.

Als die Produkte der letzteren ließen sich sowohl sekundäre Albumosen nachweisen, als auch Körper, welche wir gemäß ihrem Verhalten gegen Ammonsulfat als primäre Albumosen auffassen müssen. Es besteht somit kein Grund, in der proteolytischen Wirkung des Labs etwas prinzipiell von der peptischen Spaltung verschiedenes zu sehen. Jedenfalls handelt es sich auch hier (wenigstens bei länger dauernder Einwirkung) nicht nur um eine Loslösung einer einzigen — peripher gelegenen — Albumosengruppe, sondern um eine tiefgehende Spaltung des Kaseïnmoleküls*).

2. Bedingungen der Wirksamkeit des Ferments.

Wie die vorstehend mitgeteilten Versuche gezeigt haben, besteht bezüglich der gebildeten Spaltungsprodukte zwischen dem Lab und anderen proteolytischen Fermenten, insbesondere dem Pepsin, eine ziemlich weitgehende Übereinstimmung. Angesichts der Herkunft der Labextrakte war natürlich eine Beimengung anderer Verdauungsfermente nicht von der Hand zu weisen. Ehe aber diese Möglichkeit erwogen werden konnte, mußte ich trachten, noch andere Anhaltspunkte zur Charakterisierung dieser Ferment-

*) Das Auftreten von tieferen, kristallinischen Spaltungsprodukten wurde nicht weiter untersucht; bedeutende Mengen derselben scheinen — nach der minimalen spezifischen Drehung der mit Ammonsulfat ausgefällten Lösungen zu schließen — nicht gebildet zu werden.

wirkung zu gewinnen, als sie durch die Spaltungsprodukte gegeben sind: ich mußte die Bedingungen seiner Wirksamkeit ermitteln.

Unsere Kenntnisse über die Beeinflussung der Wirkung verschiedener Fermente durch die Reaktion der Lösung, die Temperatur, die Konzentration von Ferment und Substrat, sowie durch fördernde und hemmende Substanzen sind jetzt genügend umfassend begründet, um von einer näheren Charakterisierung der Fermentwirkung nach diesen Richtungen einen Aufschluß über die Beziehung derselben zu bekannten Fermenten erwarten zu dürfen.

Zunächst mußte die Tatsache auffallen, daß das Ferment bei (gegen Lackmus) neutraler Reaktion erhebliche Wirkungen zu entfalten vermochte.

Es war auch bei schwach saurer Reaktion der Lösung wirksam. Leider ließ sich der Einfluß stärkerer Säuregrade nicht prüfen, da stets bereits nach kurzdauernder Labwirkung eine reichliche Fällung eintrat, welche das weitere Untersuchen durch Vergleichung unmöglich machte. Der Niederschlag wurde nicht weiter untersucht. Man könnte hierbei an das von Salkowski beschriebene Paranucleïn oder auch an unverändertes Parakaseïn denken.

Versuch 6. Setzt man zu einer Lösung von Kaseïn in 0,2 Proz. HCl Lab, so tritt (bei 40°) in kurzer Zeit eine reichliche Fällung, auch bei Abwesenheit von Kalksalzen ein.

Der Einfluß alkalischer Reaktion wurde mit Rücksicht auf die geringe Toleranz des Labferments gegen Alkalien nicht geprüft.

Mit Rücksicht auf die interessante Unabhängigkeit der Milchkoagulation (bzw. der Parakaseïnbildung) von der Temperatur bot die Ermittelung des Einflusses der Temperatur auf den Umfang der Spaltung des Kaseïns durch Labferment ein gewisses Interesse.

Leider stieß die Prüfung des Einflusses höherer Temperaturen ebenfalls auf Schwierigkeiten, da die Verdauungsgemische bei 40° nach kürzerer oder längerer Zeit sämtlich geronnen; ich mußte mich also darauf beschränken, bei Zimmertemperatur gehaltene und in Eis aufbewahrte Proben miteinander zu vergleichen.

Versuch 7. Zu diesem Zwecke wurden 25 ccm einer frisch hergestellten 7 proz. Kaseïnlösung in Eis gekühlt und mit derselben Menge in Eis gekühlter neutralisierter Lablösung versetzt. Eine Probe dieser Mischung wurde sofort, eine zweite nach 10 stündigem Stehen in stets erneuertem Eis, eine dritte nach 20 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur untersucht. Die zweite und dritte Portion waren mit Toluol versetzt. Die Untersuchung geschah derart, daß jede Probe erst mit Ammonsulfat halb gesättigt, dann auf das Verhalten des Filtrates bei nachträglicher Ganzsättigung bestimmt wurde.

Die erste Probe gab eine kaum sichtbare Opaleszenz, die zweite eine ganz deutliche und ausgesprochene Trübung; bei der dritten Probe war die Trübung ein wenig stärker als bei der zweiten.

Um eine Täuschung in dieser prinzipiell wichtigen Frage auszuschließen, bestimmte ich in einem ähnlich durchgeführten Versuch quantitativ die Größe der bei Eistemperatur gebildeten Molkeneiweißfraktion.

Versuch 8. Zu diesem Zwecke wurde eine 8 proz. Kaseïnlösung in Eis gekühlt, mit gekühlter Lablösung zu gleichen Teilen vermischt, eine Probe der Mischung sofort untersucht, der Rest auf 48 Stunden unter Toluolzusatz in Eis gebracht und — bei niedriger Außentemperatur — für andauernde Eiskühlung Sorge getragen.

Die Untersuchung geschah derart, daß beide Proben mit dem gleichen Volum konzentrierter Zinksulfatlösung versetzt, nach 24 Stunden filtriert und sodann die Filtrate auf ihren N-Gehalt untersucht wurden. Er betrug in der sofort untersuchten Portion 0,150 Proz., in der bei Temperatur des schmelzenden Eises digerierten Portion 0,180 Proz.

Trotz der niedrigen Temperatur fand also eine merkliche Abspaltung von Molkeneiweiß statt; man wird somit auf Grund dieser beiden Versuche dem Labferment eine spaltende Wirksamkeit auch bei niedrigen Temperaturen zuschreiben müssen, eine Tatsache, die um so auffallender erscheint, als andere proteolytische Verdauungsfermente, z. B. Pepsin, auf Körpertemperatur angewiesen sind und bereits bei Zimmertemperatur fast unwirksam werden.

Von einer gewissen Bedeutung für unsere Auffassung über die Natur der in Rede stehenden Fermentwirkung mußte auch die Relation zwischen der Konzentration der Fermentlösungen und deren Wirkung sein.

Zur experimentellen Prüfung dieser Beziehung beabsichtigte ich zunächst, die Menge des ungespaltenen Parakaseïns zu ermitteln. Alle darauf hinzielenden Versuche, dasselbe mit Essigsäure, durch Kalkzusatz oder durch Erhitzen quantitativ zur Abscheidung zu bringen, scheiterten an dem Umstande, daß die Fermentlösungen einen erheblichen Anteil des Parakaseïns in Lösung zu halten vermochten, sowie an den oben erwähnten weiteren qualitativen Veränderungen des Parakaseïns.

Als einziger Maßstab für die Wirksamkeit des Ferments blieb mir daher die Zunahme der Molkeneiweißfraktion.

Hier, wo es sich um die Ermittelung der gesamten Albumosenmenge handelte, ist die Verwendung dieser bisher mit Erfolg verwendeten Methode, bei der nur ein Teil der Albumosen bestimmt wird, insofern nicht völlig beweiskräftig, als er Rückschlüsse auf

die Gesamtmenge der Albumosen nur unter der Voraussetzung gestattet, daß das relative Verhältnis der Albumosen zur Menge der sekundären Albumosen von Beginn der Verdauung ab annähernd unabhängig von der verwendeten Fermentmenge ist *).

Da nach den Erfahrungen von Edgard Zunz[8]) die Abspaltung der einzelnen Albumosengruppen — wenigstens beim Pepsin — in den verschiedenen Stunden eines Verdauungsversuches keine gleichmäßige ist, und demnach die Größe einer Albumosenfraktion nicht einfach proportional der Zeit ist, so durfte ich zur Ermittelung der Wirksamkeit zweier Lösungen nicht die in der gleichen Zeit gebildeten verschiedenen Albumosenmengen vergleichen, sondern vielmehr die Zeiten, innerhalb welcher die verschiedenen Fermentmengen aus dem gleichen Substrate die nämlichen Albumosenmengen zu bilden vermochten.

Von drei gleichsinnig verlaufenen Versuchen teile ich nachstehend jenen mit, welcher am besten gelungen ist und durch die Wahl der Versuchsanordnung die Wirkungsweise der Verdünnung am besten zum Ausdruck bringt.

Versuch 9. Von einer frisch hergestellten 10 proz. Kaseïnlösung wurden in einer Probe (A) 60 ccm mit 90 ccm einer gegen Lackmus neutralisierten Merck-Lablösung (1 : 10000) versetzt; in einer zweiten Probe (B) wurden 40 ccm Kaseïnlösung mit 15 ccm derselben Lablösung und 45 ccm Wasser versetzt. Beide Proben wurden, mit Toluol versetzt, bei Zimmertemperatur gehalten. Ermittelt wurde die Größe des bei Halbsättigung mit Zinksulfat in Lösung bleibenden Stickstoffanteiles zunächst bei beiden Proben unmittelbar nach dem Ansetzen derselben, bei B außerdem nach 24$^1/_2$ stündiger Digestion, bei A nach 6 Stunden, 7′, sowie nach 12$^1/_4$ Stunden. Die Bestimmung geschah in derselben Weise wie bei vorhergehenden Versuchen.

Die Resultate sind in Tabelle IV verzeichnet.

Tabelle IV.

Zeiten	Probe A (Original-Lablösung)		Probe B ($^1/_4$ Original-Lösung)	
	N-Gehalt nach Halbsättigung mit $ZnSO_4$ Proz.	Zunahme des N-Gehalts	N-Gehalt nach Halbsättigung mit $ZnSO_4$ Proz.	Zunahme des N-Gehaltes
Sofort	0,2152	—	0,085	—
Nach 6 Std. 7′	0,2257	0,0105	—	—
Nach 12 Std. 14′	0,2333	0,0181	—	—
Nach 24$^1/_2$ Std.	—	—	0,1036	0,0186

*) Dieser Punkt soll noch zum Gegenstande einer eingehenden Prüfung gemacht werden.

Wie man sieht, beträgt die von dem Viertel der Fermentmenge gebildete Albumosenmenge fast genau ebensoviel, wie die von der vollen Konzentration in der halben Zeit gebildete. Es folgt somit die Albumosenabspaltung dem Wirkungsgesetze von Schütz und Borissow, wonach die Wirkung der Quadratwurzel aus der Konzentration proportional ist.

Es hat somit durch diesen Versuch die von verschiedenen Autoren geäußerte Vermutung, daß auch die Molkeneiweißbildung dem Schützschen Gesetze folge, Bestätigung erfahren. Es schließt sich somit die spaltende Wirkung des Labferments in dieser Beziehung eng an die übrigen bekannten proteolytischen Fermente an*).

3. Welche Eiweißkörper unterliegen der Fermentwirkung?

Die in Rede stehende Fermentwirkung zeigt sowohl bezüglich der Natur ihrer Spaltungsprodukte als hinsichtlich der Bedingungen ihrer Wirksamkeit eine ziemlich weitgehende Ähnlichkeit mit anderen proteolytischen Fermenten, besonders dem Pepsin. Um so mehr drängt sich nunmehr die Frage auf, ob sie nicht allein auf eine Beimengung von Pepsin zurückzuführen ist. Unter den Ergebnissen der obigen Versuche findet sich nun allerdings ein Befund, welcher die spaltende Wirkung des Labs in einen entschiedenen Gegensatz zur Pepsinwirkung setzt: das Labferment besitzt auch bei sehr niedrigen Temperaturen spaltende Wirkung, wenngleich nicht in dem Maße wie bei Zimmertemperatur. Obgleich ich mich nun neuerdings davon überzeugen konnte, daß selbst sehr kräftige Pepsinlösungen bei Eistemperatur vollkommen unwirksam werden, so scheint mir dieser Befund allein doch nicht ausreichend, um die Anwesenheit von Pepsin in meinen Lösungen vollkommen auszuschließen, denn man weiß nicht, in wie weit bei dieser Beeinflussung durch die Temperatur die Mengenverhätnisse von Substrat und Ferment mitspielen.

Um so notwendiger war es, die Wirksamkeit dieser Lablösungen gegen andere Eiweißkörper zu studieren, eine

*) Durch eine liebenswürdige private Mitteilung von Herrn Dr. Reichel auf den prinzipiellen Unterschied zwischen den durch das „Zeitgesetz“ und das Schütz-Borissowsche Gesetz ausgedrückten Beziehungen aufmerksam gemacht, vermag ich in der Tatsache, daß die Schützsche Regel auch für die Molkeneiweißbildung zutrifft, nicht mehr einen Grund gegen die Annahme der Einheitlichkeit beider Wirkungen des Labfermentes zu erblicken, wie ich dies im Anschlusse an Fuld u. a. noch in der einschlägigen vorläufigen Mitteilung (Wiener klin. Wochenschr.) getan habe. (Vgl. die inzwischen erschienene Untersuchung von Reichel und Spiro, Diese Beiträge 8, 24.)

Frage, deren Beantwortung auch noch in anderer Hinsicht wichtig war.

Ich ließ daher die Labextrakte, welche sich als gegen Kaseïn wirksam erwiesen hatten, einwirken auf gekochtes Eiweiß, koaguliertes Serum, gekochtes Fibrin, erstarrte Gelatine, rohes Serumeiweiß.

Die Wirksamkeit der Lösungen auf die genannten Substanzen wurde zunächst unter jenen Bedingungen geprüft, unter denen sie sich als für Kaseïn wirksam erwiesen hatten: bei neutraler Reaktion und Zimmertemperatur. Um aber auch dem immerhin fernerliegenden Einwande zu begegnen, daß das Kaseïn für Pepsin wesentlich leichter und bereits unter Bedingungen angreifbar sei, unter denen die genannten Proteïnkörper nicht gespalten werden, untersuchte ich auch das Verhalten der Labextrakte gegen diese Eiweißkörper unter den für die Pepsinwirkung optimalen Bedingungen: bei stark saurer Reaktion und Körpertemperatur.

Versuch 10. Von der in früheren Versuchen benutzten, gegen Kaseïn wirksamen Lablösung werden drei Proben angesetzt: 1. mit einer Mettschen Röhre mit koaguliertem Hühnereiweiß, 2. einer mit koaguliertem Serum hergestellten Röhre, 3. einer gekochten Fibrinflocke. Nach 48 stündiger Digestion bei Zimmertemperatur zeigt sich bei Probe 1 und 2 keinerlei Veränderung, die Fibrinflocke ist geschrumpft, sonst unverändert. Auch im Laufe der nächsten Tage tritt an den Proben keine Veränderung ein.

Die genannten koagulierten Eiweißstoffe werden somit von dem Fermente unter den für Kaseïn maßgebenden Bedingungen nicht angegriffen.

Die unter den für die Pepsinwirkung günstigeren Bedingungen durchgeführten Versuche wurden derart angestellt, daß die Lablösung mit gleichen Teilen einer 0,42 proz. Salzsäurelösung versetzt, mit je einer Mettschen Röhre von Serum bzw. Eierklar und mit einer Fibrinflocke beschickt und in den Thermostaten (38°) gebracht wurde.

Über die Resultate dieses Versuches 11 gibt Tab. V Aufschluß.

Tabelle V.

	Neutral	Verdünnt mit gleichen Teilen 4,2 proz. Salzsäure
Mettsche Röhrchen mit Hühnereiweiß	Nach 24 Stunden unverändert	Nach 24 Stunden unverändert
Mettsche Röhrchen mit Serumalbumin	Nach 24 Stunden unverändert	Nach 24 Stunden 3 mm verdaut

Die verwendete Lablösung wirkte somit unter den angegebenen Verhältnissen nur auf Serumalbumin ein; man darf daher die Möglichkeit, daß dem Präparate Pepsin beigemengt war, nicht ganz zurückweisen. Betrachtet man aber die Stärke der Verdauungswirkung und berücksichtigt man die große Empfindlichkeit des Serumalbumins gegen Pepsin, so wird man zugeben, daß es sich wohl nur um Spuren von Pepsin handeln konnte, die man unmöglich mit den tiefgreifenden Spaltungen, die die Extrakte am Kaseïn hervorriefen, in Beziehung setzen kann.

Trotzdem schien es geboten, in einem weiteren Versuche eine Pepsinlösung von der gleichen Wirksamkeit gegen Serumalbumin auf ihr Verhalten gegen Kaseïn zu prüfen.

Versuch 12. Eine Lösung von 30 g Pepsin in 200 ccm 0,4 proz. HCl wird, um ihre labende Kraft abzuschwächen, durch acht Tage bei 38° digeriert. Sie vermochte dann, neutralisiert, die zehnfache Milchmenge in 12 Stunden nicht mehr dick zu legen. Darauf wird sie auf ihre peptische Wirksamkeit gegen Serumalbumin geprüft und sodann mit 0,2 Proz. HCl soweit verdünnt, als notwendig ist, ihre verdauende Kraft gegen Serumalbumin auf 6 mm pro 24 Stunden (Mett-Pollak) herabzudrücken. Diese Lösung wird neutralisiert (durch vorsichtigen Zusatz konzentrierter Natriumkarbonatlösung) und, mit 5 Proz. Kaseïnlösung zu gleichen Teilen versetzt, in der Kälte digeriert. Nach 24 Stunden wird eine Probe der Mischung mit Ammonsulfat halb gesättigt, vom Niederschlage abfiltriert und mit Ammonsulfat auf Ganzsättigung gebracht: es entsteht eine kaum sichtbare Opaleszenz.

Das gleiche negative Ergebnis wurde erhalten, wenn die eingangs erwähnte Pepsinstammlösung, welche in 16 Stunden 14 mm Serumalbumin zu verdauen imstande war (!), bei neutraler Reaktion und Zimmertemperatur auf Kaseïn einwirkte.

Durch diese Versuche wird dem Einwande, das Kaseïn könne der peptischen Spaltung gegenüber minder resistent sein als andere Eiweißkörper und daher unter Bedingungen, unter denen Pepsin andere Eiweißkörper nicht angreift, bereits der peptischen Spaltung unterliegen, jede Berechtigung entzogen. Auch ist dadurch als erwiesen anzusehen, daß die verschwindend kleine, nur gegen Serumalbumin wirksame Menge Pepsin, welche den verwendeten Extrakten beigemengt war, nicht an der Kaseïnspaltung die Schuld tragen kann.

Um auch ungeronnene Eiweißkörper heranzuziehen, wurde ferner das Verhalten der Labextrakte gegen gelöstes kristallisiertes Serumalbumin sowie gegen erstarrte Gelatine untersucht.

Versuch 13. Eine 1,8 proz. Lösung von Serumalbuminkristallen (dargestellt nach Gürber) wird mit gleichen Teilen Labextrakt versetzt und

unter Toluolzusatz bei 38° digeriert. Nach 48 Stunden wird eine Probe mit Ammonsulfat halbgesättigt. Dabei tritt keine Spur einer Opaleszenz auf, eine Spaltung des Serumalbumins — welche notwendigerweise zur Bildung einer primären Albumose geführt haben würde — hat also nicht stattgefunden.

Versuch 14. Dieselbe Lablösung wurde in zwei Proben zu gleichen Teilen verdünnt a) mit destilliertem Wasser, b) mit 0,42 Proz. Salzsäure. Beide Lösungen ließ ich sodann bei Zimmertemperatur auf Röhrchen, welche mit erstarrter Gelatine beschickt waren (Pollak) einwirken. Nach 24 Stunden waren beide Proben unverändert.

Die untersuchten Labextrakte wirken somit auf die einzelnen Eiweißkörper in auffallend ungleicher Weise ein: gelöstes Serumalbumin, Gelatine und gekochtes Eieralbumin vermögen sie gar nicht anzugreifen, koaguliertes Serumalbumin spalten sie in einem verschwindenden Ausmaße und nur unter den günstigsten Wirkungsbedingungen des Pepsins, Kaseïn hingegen bereits bei neutraler Reaktion und niederen Temperaturen, also unter Bedingungen, bei denen hochwirksame Pepsinlösungen Kaseïn unzersetzt lassen, in unverhältnismäßig stärkerem Maße. Zur Erklärung dieser starken Wirksamkeit gegen Kaseïn reicht somit der durch die Verdauung des Serumalbumins nachweisbare Pepsingehalt absolut nicht aus; es muß vielmehr neben dem Pepsin noch ein anderes proteolytisches Ferment vorhanden sein, welches nur auf das Kaseïn allein einzuwirken vermag, dieses auch bei neutraler Reaktion und sehr niedrigen Temperaturen spaltet, auf andere Eiweißkörper jedoch ohne Wirkung ist.

Selbstredend bezieht sich dies nur auf unsere derzeitigen Kenntnisse über die Wirkungsweise des Pepsins. Nach den Untersuchungen Pollaks[9]) steht zu erwarten, daß es gelingen wird, das „Pepsin“ in eine Reihe spezifisch abgestimmter Fermente aufzulösen, und es wird sich dabei vielleicht auch ein für Kaseïn spezifisches proteolytisches Ferment auffinden lassen. Nach der Vollendung der bereits in Aussicht gestellten Fortsetzung von Pollaks Untersuchungen wird es Zeit sein, die Beziehungen der von mir näher beschriebenen Fermentwirkung zum „Pepsin“ einer endgültigen Prüfung zu unterziehen.

Durch diese Versuche war somit erwiesen, daß die Labextrakte ein für Kaseïn spezifisches proteolytisches Ferment enthalten. Diese Spezifität erinnert an ein anderes Ferment des tierischen Verdauungskanals, das Erepsin, von dem durch Cohnheims[10]) Untersuchungen bekannt ist, daß es unter den oben genannten Eiweißkörpern ebenfalls nur Kaseïn anzugreifen vermag. Eine Entscheinung darüber ließ sich von der Untersuchung des Verhaltens meiner Labextrakte gegen Albumosen erwarten. Wäh-

rend bekanntlich Erepsin Albumosen energisch zu spalten vermag, zeigten sich die Labextrakte gegen „Wittepepton“, wie nachstehender Versuch bewies, ohne Wirkung.

Versuch 15. Es wurde zu 50 ccm einer 4 proz. Wittepeptonlösung 5 ccm Labextrakt gesetzt, eine Portion sofort, die andere nach 48 Stunden (Toluol, Zimmertemperatur) auf die Menge des bei Sättigung mit $ZnSO_4$ in Lösung bleibenden Stickstoffs untersucht. Dies geschah in folgender Weise. In 10 ccm wurde erst die hinreichende Menge $ZnSO_4$ eingetragen, dann nach 24 stündigem Stehen neuerdings Zinksulfat, solange es sich noch löst und in kleinen Mengen zugesetzt, die Flüssigkeit samt dem reichlichen Albumosenniederschlag in ein 30 ccm fassendes Kölbchen gebracht, die am Boden des Gefäßes verbleibende Kristallmasse wiederholt mit gesättigter Zinksulfatlösung gewaschen und der Inhalt des Kölbchens mit letzterer auf 30 ccm ergänzt. Sodann wurde nach einigem Stehen die Flüssigkeit filtriert und in je 5 ccm des Filtrates der Stickstoff bestimmt.

5 ccm der sofort verarbeiteten Probe enthielten 0,0073 g N. 5 ccm der nach 48 Stunden verarbeiteten Probe hingegen 0,0070 g N.

Das Labextrakt verdankt somit seine verdauende Kraft keiner Beimengung eines der bisher bekannten Fermente, sondern einem neuen proteolytischen Agens, welches sich gegen die ersteren durch seine strenge Spezifität für das Kaseïn scharf charakterisiert.

Zur Ergänzung der Kenntnisse über den Wirkungsbereich dieses Ferments führte ich weiterhin einen Versuch aus, der auch von physiologischen Gesichtspunkten aus geboten schien; ich untersuchte, ob sich seine Wirksamkeit nur auf lösliche Salze des Kaseïns oder Parakaseïns beschränkt, oder ob auch der unlösliche Parakaseïnkalk von Labextrakten verdaut wird.

Versuch 16. Es wurde ungekochte Kuhmilch mit dem gleichen Volum Labextrakt versetzt, rasch durchgemischt, eine Portion sofort filtriert und untersucht, die andere nach 24 stündigem Stehen bei 40° unter Toluol. Beide Proben wurden mit den gleichen Teilen konzentrierter Zinksulfatlösung versetzt, nach 24 Stunden abfiltriert und der Stickstoffgehalt des Filtrates ermittelt. Er betrug bei der sofort untersuchten Probe 0,304 Proz., bei der digerierten 0,308 Proz.!

Wie man sieht, hemmt die Anwesenheit von Kalksalz die Wirksamkeit dieses Ferments vollkommen, eine Tatsache, die um so merkwürdiger ist, als die Lablösungen bekanntlich die quantitative Abscheidung des Parakaseïnkalks beträchtlich zu hemmen vermögen, dem Fermente in diesem Falle somit sicherlich nicht nur unlösliches Parakaseïn zu Gebote stand.

Die Unangreifbarkeit des Parakaseïncalciums für das Ferment erklärt es auch, daß sich dessen weitere Wirksamkeit bisher unserer Kenntnis entzog, da bei dem hauptsächlich studierten Milch-

gerinnungsvorgange das zunächst gebildete Reaktionsprodukt (der Käse) wegen seiner Unangreifbarkeit der weiteren Fermentwirkung widersteht.

Fast erweckte das Ergebnis dieses Versuches den Anschein, als ob die Kenntnis der tieferen spaltenden Wirkungen des Labferments, wie sie obige Versuche erbrachten, nur theoretisches Interesse verdienten, und uns der Lösung der Frage nach der rätselhaften Funktion des Labferments keinen Schritt näher brächten.

Physiologische Erwägungen machten es daher wünschenswert, den letzten Versuch unter strenger Nachbildung der im Organismus gegebenen Bedingungen, also vor allem bei Anwesenheit von Salzsäure, zu wiederholen.

Versuch 17. Zu diesem Zwecke versetzte ich 6 Proz. Kaseïnlösung in je zwei Proben zu 20 ccm mit 0,5 ccm Lablösung, fügte nach einstündiger Digestion je 3 ccm 10 proz. Chlorcalciumlösung hinzu. Sodann versetzte ich die Hauptprobe mit einer Mischung vun 20 ccm Lab und 20 ccm 0,4 proz. HCl. Nach 24 Stunden wurde die Probe mit 5 ccm *n*/4-Lauge neutralisiert, dann destilliertes Wasser (20 ccm) zugesetzt, gemischt, filtriert, das Filtrat weiter untersucht.

Die Kontrollprobe wurde zunächst mit 20 ccm destilliertem Wasser und 20 ccm Salzsäure verdünnt, nach 24 stündiger Digestion durch 5 ccm *n*/4-Lauge neutralisiert, sodann mit 20 ccm Lab versetzt, filtriert und das Filtrat, ebenso wie das der Hauptprobe, mit Zinksulfat halb gesättigt und zur Bestimmung des in Lösung bleibenden Stickstoffs verwendet. Seine Menge betrug beim Filtrate der Hauptprobe 0,1456 g, bei der Kontrollprobe 0,1216 g. Aus 1,2 g Kaseïn war somit in 24 Stunden 0,0192 g Stickstoff abgespalten worden.

Unter der Einwirkung des Labextraktes wurde somit während 24 Stunden ungefähr der fünfte Teil des gesamten im Kaseïn vorhandenen Stickstoffs in Form von sekundären Albumosen abgespalten. Die Reaktion ist also von ausschlaggebendem Einfluß auf das Verhalten der Labextrakte zum Kaseïn: während letzterer bei neutraler Reaktion nicht angegriffen wird, wird er bei saurer Reaktion in ausgiebigem Maße gespalten.

Die früheren Versuche hatten in meinen Labextrakten ein Gemisch zweier proteolytischer Fermente erkennen lassen: ein in größerer Menge vorhandenes, für Kaseïn spezifisches Ferment von erheblicher Wirksamkeit und Spuren von Pepsin. Da die Bedingungen, unter denen Käse von Labextrakten verdaut wird, mit den für Pepsin optimalen Bedingungen zusammenfallen, so ist die Entscheidung, welches der beiden Fermente hierbei wirksam ist, erschwert. Kontrollversuche mit Hühnereiweiß (in Form der Mettschen Röhrchen), welche ich mit dem bei Versuch 17 benutzten

Extrakt unter den gleichen Bedingungen (0.2 proz. HCl, 40 Proz.) ausführte, ergaben, daß dieser Extrakt in der gleichen Zeit auf Hühnereiweiß vollkommen ohne Wirkung blieb.

Dies spricht nicht für einen erheblichen Pepsingehalt der Lablösung; immerhin aber könnten Differenzen in der Spaltbarkeit des Käses und des Eiereiweiß durch Pepsin bestehen, welche die Heranziehung dieser Kontrolle illusorisch machen können. Eine Entscheidung in dieser Frage erwarte ich mir von eben im Gange befindlichen Versuchen, die mit sauren Lablösungen in der Kälte, also unter für Pepsin ungünstigen Bedingungen, durchgeführt werden.

Es wird meine weitere Aufgabe sein, das Ferment auch im *Sekrete* der Magenschleimhaut aufzusuchen, um zu entscheiden, ob es nur ein Bestandteil der *Labextrakte* oder auch ein im *Innern des Magendarmkanals* anzutreffendes Ferment ist. Die Beantwortung beider oben genannten Fragestellungen wird zeigen, in wie weit diese neue Fermentwirkung der Labextrakte eine Beziehung zur Resorption der Milch besitzt.

Zum Schlusse drängte sich noch eine den Wirkungsbereich dieses Ferments betreffende Frage auf: die bekannte Ungerinnbarkeit der Frauenmilch ließ es wünschenswert erscheinen, festzustellen, ob auch das *Frauenkaseïn* der Wirkung des Ferments ebenso unterliegt wie das Kuhkaseïn.

Versuch 18. Zu diesem Zwecke wurde einer Amme frisch entnommene Milch in zwei Partien geteilt, deren eine mit demselben Volum *Merck*scher Lablösung versetzt wurde. Beide Proben wurden mit Toluol versetzt und 68 Stunden bei 40° gehalten.

Sodann wurde zur mit Lab behandelten Probe das gleiche Volum konzentrierter Zinksulfatlösung zugesetzt, die andere Probe wurde rasch mit dem gleichen Volum Lablösung und dem doppelten Volum Zinksulfat versetzt, beide Proben nach 24 Stunden filtriert. Der Stickstoffgehalt der Filtrate betrug bei der von vorn herein mit Lab digerierten Probe 0.245 Proz., bei der Kontrollprobe 0.238.

Die Differenzen fallen, wie man sieht, vollkommen in den Bereich der Fehlergrenzen, was in Erwägung der langdauernden Einwirkung (68 Stunden!) um so deutlicher erkennen läßt, daß dem Ferment die Fähigkeit, aus Frauenkaseïn Molkeneiweiß abzuspalten, nicht zukommt; Frauenmilch scheint somit für die in den Extrakten des Rindermagens enthaltenen Fermente in *keiner* Weise angreifbar zu sein.

4. Beziehungen der Milchgerinnung zur proteolytischen Wirksamkeit des Labferments.

Wie eingangs erwähnt, hat die Auffindung des Molkeneiweißes unter den Produkten der Milchgerinnung Veranlassung gegeben, im Labferment ein proteolytisch wirkendes Enzym zu erblicken.

Die Ergebnisse unserer bisherigen Versuche berechtigen uns um so weniger, Hammarstens ursprüngliche Ansicht von der Zusammengehörigkeit beider Fermentwirkungen abzulehnen, als ihnen, im Gegensatz zu vielen anderen die Eiweißkörper betreffenden Fermentwirkungen, eine ausgesprochene Spezifizität für Kaseïn zukommt.

Ich untersuchte daher zunächst, ob ein Parallelismus zwischen der Gerinnungszeit und der im Momente der Gerinnung abgespaltenen Menge Molkeneiweiß besteht.

Zu diesem Zwecke ermittelte ich in nachstehendem Versuche die Menge Molkeneiweiß, welche bei der Gerinnung einer und derselben Milchmenge (gleicher Qualität) durch verschiedene Mengen des gleichen Labferments erhalten wurden.

Versuch 19. Von Merckscher Lablösung werden zwei Verdünnungen hergestellt: eine 6 proz. (*A*) und eine im Verhältnis 3 : 10 000 angefertigte (*B*).

A bringt die zehnfache Milchmenge in 43″, *B* in 2 Stunden 45′ zur Gerinnung. Es werden von beiden Lösungen 5 ccm zu 50 Milch zugesetzt; nach Eintritt der Gerinnung wird die Molke sofort abfiltriert, mit dem gleichen Volum konzentrierten Zinksulfates versetzt, nach 24 Stunden filtriert. Der Stickstoffgehalt betrug beim Filtrat von *A* 0,091 Proz., beim Filtrat von *B* hingegen 0,112 Proz.

Der Stickstoffgehalt der Lablösung war so gewählt worden, daß er analytisch nicht in Rechnung zu setzen war (die Lösung *A* enthielt 0,09 Proz. N).

Wie man sieht, sind die Molkeneiweißmengen, welche bei der Gerinnung einer und derselben Milchgattung unter Verwendung der gleichen Lablösung gebildet werden, verschieden, wenn die Gerinnungszeiten ungleiche sind: die beiden Fermentwirkungen halten also nicht gleichen Schritt, und man kann somit die Menge des im Momente der Gerinnung gebildeten Molkeneiweißes nicht als für den Zeitpunkt der Gerinnung maßgebend ansehen.

Dies macht nun zwar die ursprüngliche Auffassung von der Spaltung des Kaseïns in Parakaseïn und Molkeneiweiß unwahrscheinlich. Aber es wäre dennoch nicht ausgeschlossen, daß die erwähnte Abspaltung des Kaseïns und die Gerinnung in einem entfernteren Zusammenhang stehen, der Art, daß das Parakaseïn (ebenso wie die

von mir beschriebene nicht mehr mit Kalk fällbare Kaseïnmodifikation) in dem Spaltungsvorgang eine ähnliche Rolle spielen würde, wie das Acidalbumin bei der Wirkung des Pepsins.

Um über die Frage der Beziehung beider Fermentwirkungen zueinander zu einer Entscheidung zu gelangen, studierte ich das Verhalten beider in Labextrakten, deren Wirksamkeit durch chemische Schädigungen herabgesetzt war. Ich betrat dabei einen Weg, der in letzter Zeit von Pollak behufs Trennung differenter Fermentwirkungen mit Vorteil benutzt worden ist.

Nach mehrfachen Vorversuchen wählte ich hierzu die Behandlung der Labextrakte mit Alkalikarbonaten.

Bekanntlich ist die gerinnungserregende Komponente des Labferments gegen Alkalien und auch gegen Sodalösung ziemlich empfindlich. Es zeigte sich jedoch bei meinen Versuchen, daß diese schädigende Wirkung ihre Grenzen hat, da Labextrakte längere Zeit mit $^1/_4$ Normalsodalösung digeriert werden konnten, ohne ihre Wirksamkeit vollkommen einzubüßen.

Ich stellte nun derartig geschwächte Lablösungen her, ermittelte ihre Gerinnungswirkung durch Bestimmung der Gerinnungszeit und stellte andererseits aus dem ursprünglichen ungeschwächten Labextrakt durch Verdünnung Lösungen von genau gleicher Gerinnungswirkung her. Ich ließ sodann beide Lösungen unter gleichen Versuchsbedingungen auf kalkarmes Kaseïn einwirken und verglich die in derselben Zeit gebildeten Mengen Molkeneiweiß.

Wird die Koagulations- und die Spaltungswirkung durch dieselbe Komponente des Labferments hervorgerufen, so ist zu erwarten, daß beide Wirkungen durch schädigende Einflüsse gleichmäßig betroffen werden, und demnach im vorliegenden Falle beide Proben auch bezüglich der Molkeneiweißbildung Übereinstimmung zeigen.

Versuch 20. Merckscher Lablösung wird tropfenweise konzentrierte Natriumkarbonatlösung zugesetzt, bis dieselbe einer $^1/_{12}$-Normalkarbonatlösung entspricht. Nach $2^1/_2$ stündiger Digestion bei 40° wird die Probe abgekühlt und unter sorgfältiger Kontrolle der Reaktion mit Essigsäure vorsichtig neutralisiert. Diese Lösung bringt die zehnfache Milchmenge in 31″ zur Gerinnung. Es wird sodann von der ursprünglichen Lablösung eine 16 fache Verdünnung von vollkommen gleicher Wirksamkeit gegen Milch hergestellt. Sodann wird von der zu den Gerinnungsversuchen benutzten Milch durch Fällung mit Essigsäure, Dekantation mit größeren Mengen Wasser und Aufnehmen in 1 proz. Natriumkarbonatlösung bis zu noch saurer Reaktion ein Kaseinpräparat hergestellt und die Lösung auf

das Volum der anfänglich verarbeiteten Milchmenge gebracht. Sowohl von der durch Alkali geschwächten, als von der verdünnten Lablösung werden Proben mit der gleichen Menge der Kaseïnlösung versetzt und bei Zimmertemperatur (unter Toluol) 48 Stunden digeriert.

Von beiden Proben wurde zu Beginn und am Ende der Digestion der bei Halbsättigung mit Zinksulfat in Lösung bleibende Stickstoff ermittelt.

Die Resultate dieses und des folgenden Versuchs sind auf Tab. VI zusammengestellt.

Tabelle VI.

N-Gehalt der Molkeneiweißfraktion	Durch Karbonat geschwächte Lablösung und Kaseïn			Verdünnte Lablösung und Kaseïn		
	sofort Proz.	nach Digestion Proz.	Differenz Proz.	sofort Proz.	nach Digestion Proz.	Differenz Proz.
Versuch 20	0,175	0,201	0,026	0,063	0,098	0,035
„ 21	0,168	0,175	0,007	0,060	0,080	0,029

Versuch 21. Versuchsanordnung ähnlich wie in dem vorhergehenden Versuch.

Die Konzentration der Karbonatlabmischung an Karbonat betrug $^{1}/_{4}$-Normal, die Digestionszeit 38 Stunden. Die neutralisierte Probe bringt die zehnfache Milchmenge in 34 Sekunden zur Gerinnung.

Die beiden Lablösungen wurden ebenfalls 48 Stunden auf frisch hergestelltes Kaseïn einwirken gelassen.

Wie ein Blick auf Tabelle VI zeigt, stimmen die beiden gegen Milch gleich wirksamen Lösungen bezüglich der Molkeneiweißbildung durchaus nicht überein — bei Vers. 21 sind die Differenzen sogar sehr erhebliche, da die mit Alkalikarbonat geschwächte Probe nur den dritten Teil der von der verdünnten Probe gebildeten Molkeneiweißmenge abzuspalten vermochte. Die spaltende Komponente ist somit entschieden weniger resistent gegen Alkalikarbonat und es spricht entschieden gegen die substantielle Einheitlichkeit beider Fermentwirkungen, daß es gelingt, beide durch dasselbe Agens in verschiedener Weise zu beeinflussen.

Ich versuchte nunmehr, die verschiedene Resistenz beider Komponenten gegen Alkalikarbonat zur vollständigen Trennung derselben voneinander — wenigstens in ihren Wirkungen — auszunutzen.

Zu diesem Zwecke setzte ich die Digestion einer Lablösung mit Alkalikarbonat so lange fort, bis es mir gelang, zu einem Präparate zu kommen, welches eine spaltende Wirkung auf Kaseïn nicht mehr auszuüben vermochte.

Versuch 22. Ich setzte zu Merckscher Lablösung konzentrierte Natriumkarbonatlösung zu, bis eine n/4-Natriumkarbonatlösung erreicht war. Nach 72 stündiger Digestion bei 40° neutralisierte ich die abgekühlte Lösung vorsichtig mit Essigsäure und prüfte ihr Verhalten gegen Milch. Sie vermochte das gleiche Milchvolum in 9 Minuten dick zu legen. Ich fällte nunmehr aus 50 ccm derselben Milchsorte das Kaseïn mit Essigsäure, wusch es durch wiederholtes Dekantieren, löste das ganze Kaseïn durch tropfenweisen Zusatz von 1 Proz. Natriumkarbonat und Verreiben in der Reibschale, brachte die Lösung auf das Anfangsvolum von 50 ccm, entfernte das mitgerissene Butterfett durch die Zentrifuge, und versetzte nun die leicht opaleszente, schwach sauer reagierende Kaseïnlösung mit dem gleichen Volum der eingangs erwähnten abgeschwächten Lablösung (welche das gleiche Volumen Milch in 9 Minuten zur Gerinnung brachte).

Dieser Mischung entnahm ich nun sowohl gleich nach der Vereinigung, sowie nach 24 stündiger Digestion bei Zimmertemperatur (Toluol) Proben, die ich mit dem gleichen Volumen gesättigter Zinksulfatlösung versetzte, nach 24 Stunden filtrierte, und zur Ermittelung des N-Gehaltes benutzte. Die Untersuchung ergab für 15 ccm des Filtrates:

vor der Digestion	0,0234 g N
bzw.	0,02336 „ „
	(Mittel 0,156 Proz. N)
nach der Digestion	0,0238 g N
bzw.	0,0236 „ „
	(Mittel 0,158 Proz. N)

Wie man sieht, fällt der Unterschied zwischen beiden Proben noch weitaus innerhalb der Fehlergrenzen der Kjeldahlschen Methode. Ich hatte also durch die Karbonatbehandlung eine Lablösung gewonnen, welche zwar noch Milch zur Gerinnung zu bringen, aber selbst in dem 160 fachen Multiplum der Gerinnungszeit aus der gleichen Kaseïnmenge keine methodisch nachweisbare Menge Stickstoff abzuspalten vermochte.

Das Ergebnis dieses Versuches spricht sehr gegen die Auffassung, daß die Milchgerinnung die Folge, oder auch nur eine im Beginn auftretende Begleiterscheinung eines Spaltungsvorganges ist, und bekräftigt die von Hillmann, Hammarsten, Fuld, Loevenhart u. a. geäußerten Bedenken gegen die Einheitlichkeit der proteolytischen und koagulierenden Wirkung des „Labferments“.

Analytische Belege.

Versuch 1. Je 5 ccm des Filtrates entsprechen:

Nach 5 Minuten	0,70 ccm n/4-Lauge
„ 5 „	0,70 „ „ „
„ 1 Stunde	0,70 „ „ „
„ 1 „	0,70 „ „ „
„ 5 Stunden	0,85 „ „ „

Nach 5 Minuten . . . . . . 0,85 ccm n/4-Lauge
„ 24 „ . . . . . . 0,90 „ „ „
„ 24 „ . . . . . . 0,90 „ „ „
„ 48 „ . . . . . . 1,15 „ „ „
„ 48 „ . . . . . 1,25 „ „ „

Versuch 2. Je 5 ccm des Filtrates entsprechen:
Nach 15 Minuten . . . . . . 1,1 ccm n/4-Lauge
„ 3 Stunden . . . . . . 1,1 „ „ „
„ 3 „ . . . . . . 1,2 „ „ „
„ 7 „ . . . . . . 1,35 „ „ „
„ 7 „ . . . . . . 1,35 „ „ „
„ 24 „ . . . . . . 1,7 „ „ „
„ 24 „ . . . . . . 1,7 „ „ „
„ 48 „ . . . . . . 1,85 „ „ „
„ 48 „ . . . . . . 1,80 „ „ „

Versuch 7. 10 ccm des Filtrates entsprechen:
bei der sofort untersuchten Probe . . . 4,3 ccm
„ „ „ „ „ . . . 4,25 „
„ „ autodigerierten Probe . . . . . 5,15 „
„ „ „ „ . . . . . 5,10 „

Versuch 8. Je 30 ccm des Filtrates entsprechen bei Probe *A*:
sofort . . . . 18,5 ccm n/4-L
„ . . . . 18,4 „ „ „
nach 6 Stunden . . . . 19,3 „ „ „
„ 6 „ . . . . 19,4 „ „ „
„ 12 „ . . . . 20,0 „ „ „
„ 12 „ . . . . 20,0 „ „ „

bei Probe *B*:
sofort . . . . 7,3 ccm n/4-L
„ . . . . 7,3 „ „ „
nach 24 Stunden . . . . 8,95 „ „ „
„ 24 „ . . . . 8,80 „ „ „

Versuch 15. Je 5 ccm des Filtrates entsprechen:
sofort . . . . 2,1 ccm n/4-Lauge
„ . . . . 2,2 „ „ „
nach Digestion . . . . 2,0 „ „ „
„ „ . . . . 2,0 „ „ „

Versuch 16. 3 ccm des Filtrates entsprechen bei:
der sofort verarbeiteten Probe 2,6 ccm n/4-Lauge
„ „ „ „ 2,55 „ „ „
5 ccm bei der digerierten Probe 4,4 „ „ „
5 „ „ „ „ „ 4,55 „ „ „

Versuch 17. 20 ccm entsprechen:
bei der Labprobe . . . . . . 8,3 ccm n/4-Lauge
„ „ „ . . . . . . 8,35 „ „ „
„ „ Kontrollprobe . . . . 6,95 „ „ „
„ „ „ . . . . 6,90 „ „ „

Versuch 18. Je 5 ccm des Filtrats entsprechen:

beim Hauptversuch	3,5 ccm n/4-Lauge
„ „	3,5 „ „ „
bei der Kontrollprobe	3,3 „ „ „
„ „ „	3,4 „ „ „

Versuch 19.

A)	10 ccm	=	2,6 ccm n/4-Lauge
„	10 „	=	2,6 „ „ „
B)	5 „	=	1,65 „ „ „
„	5 „	=	1,65 „ „ „

Versuch 20. Je 10 ccm des Filtrates entsprechen:

„Verdünnt" sofort . . .	1,85, 180 ccm n/4-Lauge
„ hinterher . .	2,85 ccm n/4-Lauge
„ „ . .	2,80 „ „ „
„Alkal." sofort	5,0 „ „ „
„ „	5,0 „ „ „
„ hinterher . . .	5,75 „ „ „
„ „ . . .	5,70 „ „ „

Versuch 21. Je 10 ccm entsprechen:

Verdünnt sofort	1,75, 1,70 ccm n/4-Lauge
„ hinterher . .	2,3, 2,3 „ „ „
alkalisch sofort	4,8, 4,75 „ „ „
„ hinterher . . .	5,0, 5,0 „ „ „

Versuch 22. 15 ccm entsprechen:

vorher	6,7 6,675 ccm n/4-Lauge
hinterher	6,30, 6,75 „ „ „

Literaturverzeichnis.

[1]) Olof Hammarsten, Zur Kenntnis des Kaseïns und der Wirkung des Labferments. Nova acta. Upsala 1877.

[2]) E. Fuld., Über die Milchgerinnung durch Lab, Diese Beiträge 2, 169. Derselbe, Über Milchgerinnung durch Lab, Spiro-Ashers Ergebnisse 1, 16.

[3]) Hillmann, Beiträge zur Kenntnis des Einflusses des Labferments auf die Milcheiweißstoffe. Milchzeitung 25, 86.

[4]) Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 114.

[5]) Loevenhart, Über die Gerinnung der Milch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 177.

[6]) Laqueur, Über das Kaseïn als Säure und seine Unterschiede gegen durch Labwirkung verändertes Kaseïn, Diese Beiträge 7, 14.

[7]) Alexander, Zur Kenntnis des Kaseïns und seiner pept. Spaltungsprodukte, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 411.

[8]) E. Zunz, Über den quantitativen Verlauf der pept. Eiweißspaltung, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 172.

[9]) Leo Pollak, Diese Beiträge 6.

[10]) Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 33 u. 35.

XXI.

Beeinflussung und Natur des Labungsvorganges.

Von **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Dritte Mitteilung*).

1.

Wie Hammarsten[2]) zuerst gezeigt hat, macht sich die chemische Einwirkung des Labs auf Kaseïn selbst in dem Falle geltend, daß bei Abwesenheit der nötigen Kalkphosphatmenge die Gerinnung ausbleibt, indem die Kaseïnlösung durch die Einwirkung des Labs immer in der Weise verändert wird, daß das veränderte Kaseïn bei Anwesenheit einer gewissen Menge von Kalksalzen nicht mehr gelöst bleiben kann. Hammarstens Schüler, L. V. Lundberg[3]), hat später gezeigt, daß das Calcium, wenn auch nicht mit demselben Vorteil, durch Baryum, Strontium, Magnesium, die Phosphorsäure durch Schwefel-, Salpeter- und Salzsäure ersetzt werden kann. Da ferner, wie Hammarsten angegeben hat, eine durch Lab veränderte, nicht gerinnende Kaseïnlösung auf Zusatz von Kalksalzen „sogleich" einen Niederschlag gibt, so hat man allgemein angenommen, daß die Ausscheidung des Käses, die zweite Phase der Milchgerinnung, nichts weiter ist als eine Umsetzung zwischen den Parakaseïn- und Ca-Ionen.

Nun läßt sich leicht zeigen, daß auch die zweite Phase der Kaseïngerinnung ein etwas komplizierterer Vorgang ist. Setzt man zu Milch genügend Oxalat, um die Labung zu hindern, dann Labferment und hält die Probe wenigstens so lange bei 37°, bis eine Kontrollprobe geronnen ist, kühlt dann die Probe auf 0° ab und fügt nun die dem Oxalatzusatz entsprechende Menge eines Kalksalzes hinzu, so tritt keine Gerinnung ein. Erwärmt man jedoch auf 20°, so erfolgt typische Ausscheidung des Käsegerinnsels.

*) Vorgetragen in der Sitzung des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins zu Straßburg am 17. November 1905[1]).

Das Ausbleiben der Käseabscheidung bei tiefer Temperatur konnte durch physikalische oder durch chemische Ursachen bedingt sein. Was erstere anlangt, so war es z. B. möglich, daß durch die niedere Temperatur zwar nicht die (Ionen-) Reaktion, vielleicht aber die Abscheidung des schon fertigen Käses gehindert würde, wie ja auch die Aussalzung der Kolloide durch tiefe Temperaturen gehemmt wird. Eine solche Annahme wird aber durch folgenden Versuch unwahrscheinlich: Salzt man aus der gelabten, kalkhaltigen Milch bei tiefer Temperatur das Kaseïn bzw. Parakaseïn aus, setzt dann zu dem Ausgesalzenen von neuem Wasser hinzu, so löst es sich wieder auf, das Ausgesalzene kann also nicht Parakaseïncalcium (Käse) gewesen sein, das ja in Wasser unlöslich ist.

Auf folgendem Wege ließ sich nun der direkte Beweis erbringen, daß es sich bei der Parakaseïnausfällung um eine chemische, erst in der Wärme stattfindende Reaktion handelt. Wie in der vorhergehenden Arbeit gezeigt, werden bei der Käsebildung neutralisierbare H-Ionen frei; folgender Versuch zeigt, daß dieser Prozeß bei der Käseausfällung vor sich geht.

Von drei Proben, die je 20 ccm Milch und 2 ccm n-Ammonoxalat enthalten, wird die erste mit 2 ccm n-$CaCl_2$ und 0,1 Lablösung in der Wärme, die zweite ebenso nur mit gekochter Lablösung, die dritte in der Kälte mit 0,1 genuiner Lablösung, dann nach einiger Zeit mit 2 ccm n-$CaCl_2$ versetzt. Dann werden alle drei Proben mit je 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung und 0,5 g festen Ammonsulfats versetzt und je 50 ccm titriert. Bei Probe I sind zur Neutralisation 1,2, bei II und III aber 1,85 ccm $n/_{10}$-Säure nötig.

Eine naheliegende Analogie für die Parakaseïnkalkabscheidung bietet die Bildung des sekundären Calciumphosphats aus dem primären Salz, die auch in der Wärme statthat. $Ca(H_2PO_4)_2 = CaHPO_4 + H_3PO_4$ oder $3\,Ca^{\cdot\cdot} + 2\,HPO_4'' = Ca_3P_2O_8 + 2\,H^{\cdot}$. Wie ich mich durch besondere Versuche überzeugte, ändert sich auch hierbei trotz des Auftretens neutralisierbarer H-Ionen die Molekelzahl nicht wesentlich; so sank der Gefrierpunkt in einem Fall trotz der reichlichen Abscheidung nur von $-0{,}745^0$ auf $-0{,}726^0$. Es ist dies natürlich nur eine Analogie, Salzumwandlung polyvalenter Säuren, denn daß die Bildung von Kalkphosphat nichts mit der Labgerinnung zu tun hat, haben Hammarsten und dessen Schüler gezeigt.

Die Ausscheidung des Käses ist übrigens bezüglich der Temperatur auch von der Menge der Kalkionen abhängig, denn als ich 5 ccm einer Milch mit steigenden Mengen n-Oxalatlösung versetzte, war bei Zusatz von bis 0,3 ccm die Gerinnung schon bei 37° möglich, bei 0,4 erst bei 45°, bei 0,5 erst bei 51°, bei 0,6 erst bei 61°.

2. Die spezifische verdauende Wirkung des Labs auf Kaseïnlösungen.

Die physikalisch-chemische Analyse, wie sie in den vorhergehenden Mitteilungen von Reichel und mir versucht worden ist, gestattet nicht, endgültiges über das Wesen des Gerinnungsvorganges auszusagen; um so mehr verdienen die Versuche neuerliche Berücksichtigung, die mit chemischen Methoden den Vorgang untersucht haben. Nachdem zuerst O. Hammarsten[2]) gezeigt hatte, daß bei der Gerinnung der Milch mit Lab außer dem unlöslichen Käse ein peptonähnlicher Stoff, das „Molkeneiweiß", entsteht und in Lösung bleibt, hat H. Köster[4]) letzteres in größerer Menge dargestellt und als C- und N-ärmer und P-frei befunden. Diese Versuche sind in ihrer Beweiskraft von Duclaux[5]) angegriffen worden und in neuerer Zeit hat sich eine große Anzahl von Forschern dazu geneigt, bei der Gerinnung nicht eine Spaltung, sondern eine Umwandlung des Kaseïns anzunehmen[6]).

Es erschien daher wünschenswert, die Bildungsbedingungen und die Natur des peptonähnlichen Körpers mit verbesserten Methoden zu untersuchen.

Die ersten Versuche über das Molkeneiweiß Hammarstens wurden an Milch angestellt; es konnten zwar im Filtrat des Kaseïns Albumosen nachgewiesen werden, es mußte jedoch unentschieden bleiben, inwieweit die in jedem Fall nur sehr geringe Proteolyse dem Lab oder einem von Anfang in der Milch vorhandenen bakteriellen oder autolytischen Ferment zuzuschreiben war. Um diesen Schwierigkeiten zu entgehen, wurden dann alle weiteren Versuche an Lösungen eines Kaseïnpräparates gemacht, das ich mir selbst nach Hammarstens Vorschriften dargestellt hatte. Erst nachdem hier die Erscheinungen im wesentlichen studiert waren, wurden die Versuche an der Milch wiederholt, wobei es sich als zweckmäßig erwies, kalkfreie Milch (Oxalatzusatz und Dialyse) zu verwenden, da das unlösliche Kalksalz des Parakaseïns der Proteolyse schwerer zugänglich ist als der Eiweißkörper selbst.

Von einer Lösung des Kaseïns in verdünnter Soda, die mit verdünnter Phosphorsäure neutralisiert war und beim Erwärmen für sich nicht gerann, wurde Probe I mit Chlorcalcium, Probe II mit gekochtem Lab und Chlorcalcium und Probe III mit genuinem Lab und Chlorcalcium versetzt, nachdem sie alle drei auf 40° erwärmt waren. Probe III gerann nach anderthalb Minuten, die beiden anderen wurden sofort nach Hammarsten mit Essigsäure versetzt und koaguliert; nur in Probe III ließ sich im Filtrat durch Aussalzung das Vorhandensein von Albumosen deutlich nachweisen (eine

geringe im Filtrat von II nachweisbare Trübung bei 70 Proz. Sättigung mit Ammonsulfat rührte, wie ein Kontrollversuch zeigte, von der Lablösung her).

Damit ist neuerlich bewiesen, daß auch reinstes Kaseïn durch das Labferment in kürzester Zeit in nachweisbarer Menge gespalten wird.

Der Einwand, daß das Ausgesalzene nicht Albumosen, sondern der Koagulation entgangenes Kaseïn bzw. Parakaseïn sei, ließ sich durch fraktionierte Aussalzung des Filtrates widerlegen; es ließen sich wenigstens drei Albumosen heraustrennen, deren Fällungsgrenzen sind: 1,0 bis 2,6, 2,6 bis 4,4 und 5,2 bis 7,0.

Da die käuflichen Labpräparate sicher keine einheitlichen Körper sind (die von mir verwendeten sind dieselben, die H. Bayer*) im hiesigen Institut auf ihre Plasteïnwirkung untersucht hat), lag der Verdacht nahe, daß die Proteolyse durch beigemengtes Pepsin verursacht sein könne. Dies scheint mir jedoch durch folgende Punkte widerlegt zu werden:

1. Die Wirkung tritt auch bei gegen Phenolphtaleïn absolut neutraler Reaktion ein. Wie Dr. Holtzmann im hiesigen Institut zeigte, ist die Wirkung des Pepsins in solcher neutralen Lösung nur ganz minimal, praktisch gleich Null.

2. Die Wirkung — und hier ist besonders hervorzuheben die vollkommene Analogie mit der koagulierenden Wirkung des Labs — tritt auch unterhalb 20° reichlich ein.

3. Das Lab wirkt nur auf Lösungen von Kaseïnnatrium; weder bei Lösungen von kristallisiertem Eieralbumin noch bei rohem Käse (Parakaseïncalcium) ließ sich eine Wirkung zeigen.

4. Die proteolytische Verdauung durch Lab unterscheidet sich ferner von der mittels Pepsin durch den ganz andersartigen Verlauf. Ich habe hierüber je 10 Versuche an kalkfreier Milch und an Kaseïnlösungen angestellt, in denen ich den gesamten nichtkoagulablen (bzw. durch Essigsäure nicht fällbaren) Stickstoff bestimmte. Die erhaltenen Kurven sind darum nicht eindeutig, weil ich bisher noch nicht das Verhalten der einzelnen Fraktionen bei der Labverdauung feststellen konnte und weil das Lab sicher Plasteïnferment enthielt, das die Menge des nichtkoagulablen Stickstoffs verändert haben konnte. Erst nach Eliminierung dieser beiden Fehlerquellen wird sich etwas über den Gang der Proteolyse aussagen lassen, doch konnte ich schon folgende Unterschiede vom Pepsin feststellen: a) die Proteolyse ist nie so vollständig wie beim Pepsin, es wurden nur höchstens 5, 10, 15 Proz. des ge-

*) Diese Beiträge 4, 555.

samten Stickstoffs in die nichtkoagulable Form eingeführt. Wichtiger als dieser Punkt ist bei der wechselnden Wirksamkeit der Fermentlösungen, daß b) ich in allen meinen Versuchen noch nach 48 Stunden, ja sogar nach dreiwöchentlicher Verdauung, ein Neutralisationspräcipitat erhielt, während dieses bei der Pepsinverdauung schon nach 24 Stunden minimal ist (Blum[7]).

Damit ist wohl einwandfrei nachgewiesen, daß die proteolytische Wirkung dem Labpräparat selbst und nicht beigemengtem Pepsin zukommt.

Bei dem nachgewiesenen außerordentlich schnellen Eintreten der verdauenden Wirkung des Labs, die ganz der koagulierenden entspricht, und bei der genau gleichen Spezifizität liegt es natürlich nahe, beide Wirkungen als ursächlich miteinander verknüpft anzusehen. Hierbei muß jedoch beachtet werden, daß 1. die verdauende Wirkung, wie ich stets feststellen konnte, über den Zeitpunkt hinaus stattfindet, wo in der kalkhaltigen Probe die Gerinnung einsetzt, und daß infolgedessen 2. Kaseïn durch die verdauende Wirkung leicht so verändert wird, daß es vom Parakaseïn sich sehr wesentlich unterscheidet, nämlich nicht mehr durch Kalk gefällt wird, also keinen Käse mehr bilden kann. Zu einer einwandfreien Aufklärung müßten wir beide Vorgänge — Gerinnung und Verdauung — quantitativ übersehen und die Fehlerquellen einigermaßen abschätzen können. Solange wir jedoch weder die Löslichkeitsverhältnisse der hier vorliegenden Kolloide noch die proteolytische Fermentwirkung genau beschreiben und abmessen können, erscheint es mir verfrüht, einen Zusammenhang beider Vorgänge zu behaupten oder zu leugnen.

Eine physiologische Bedeutung möchte ich der tiefer greifenden verdauenden Wirkung des Labs im übrigen vorläufig nicht zuschreiben, da nicht nur andere viel wirksamere Verdauungsfermente im Organismus vorhanden sind, sondern vor allem weil unter normalen Umständen aus Kaseïn bei Gegenwart von Calciumionen Käse entsteht, auf den das Lab ja nicht weiter einwirkt.

Literatur.

1) Vgl. H. Reichel und K. Spiro, Diese Beiträge 7, 485; 8, 15.
2) O. Hammarsten, Jahresbericht für Tierchemie 4, 135.
3) L. V. Lundberg, Jahresbericht für Tierchemie 6, 11.
4) Hugo Köster, Jahresbericht für Tierchemie 11, 14.
5) Duclaux, Traité de Microbiologie 2, Kap. XVI.
6) Vgl. die trefflichen Ausführungen E. Fulds in seinem kritischen Referat: Ergebnisse der Physiologie 1, 1, 486.
7) Léon Blum, Zeitschrift für physiologische Chemie 30, 26.

XXII.

Die Wirkung des Lecithins auf den Stoffwechsel.

Von Dr. **B. Slowtzoff** (Petersburg).

1.

Die Anwendung des Lecithins bei der Behandlung verschiedener Krankheiten scheint gute Resultate zu geben. Der Mechanismus dieser günstigen Wirkung ist aber bisher ganz unerklärt. Beim Studium der Literatur begegnet man so widersprechenden Angaben, daß es fast unmöglich ist, sich eine einheitliche Vorstellung über die Wirkung des Lecithins zu bilden. Es schien mir deswegen wünschenswert, die Frage neuerdings experimentell zu bearbeiten, um über einige Punkte Klarheit zu schaffen. Die erste Angabe über die Wirkung des Lecithins auf den Stoffwechsel gehört Selenski an[1]). Er setzte einen Hund auf eine aus Eierklar, Stärke, Schmalz und Kochsalz zusammengesetzte Nahrung und bestimmte Einnahme und Ausgabe von Stickstoff und Phosphorsäure.

Tabelle I.

Nr. der Periode	Gewicht des Tieres	Einnahme			Ausgabe		Bilanz für	
		N	P_2O_5	Kal.	N	P_2O_5	N	P_2O_5
	kg	g	g		g	g	g	g
				Kontrollperioden.				
1	7,64	9,06	0,207	18,36	9,23	0,292	— 0,17	— 0,085
2	7,52	9,49	0,209	18,81	9,60	0,608	— 0,11	— 0,399 (?)
							Mittel — 0,14	
				Lecithinperioden.				
3	7,53	9,89	1,593	18,82	8,89	1,347	+ 1,01	+ 0,246
4	7,46	9,97	2,314	19,19	9,60	1,840	+ 0,37	+ 0,454
5	7,64	9,08	1,796	22,88	8,78	1,066	+ 0,30	+ 0,730
							Mittel + 0,56	

Man sieht, daß die Zufuhr von 9,06 bis 9,49 g Stickstoff und 0,207 bis 0,209 g P_2O_5 pro Tag nicht hinreicht, die Ausgaben zu decken. Wenn aber fast dieselbe Stickstoffmenge mit Zugabe von Lecithin (in Form von Eidotterätherextrakt) eingeführt wird, so erhält man einen kleinen Stickstoffansatz.

Obgleich einige Zahlen (z. B. die P_2O_5-Ausscheidung während der zweiten Periode) bedenklich sind, kann man einen günstigen Einfluß des Lecithins auf den Stoffwechsel nicht verkennen.

Einige Jahre später erschien die Untersuchung von Serono[2]).

Ein Hund, 10,8 kg schwer, bekam pro Tag 300 g Brot und 100 g Fleisch (10,11 g O). Lecithin wurde jeden zweiten Tag (à 1 bis 1,5 g) subkutan injiziert. Nach 10 Tagen betrug das Gewicht des Tieres 11,92 kg. Die N- und P_2O_5-Ausscheidung im Harn stieg während des Versuches von 7,42 g auf 9,17 g und von 0,549 g auf 0,671 g.

Ein zweiter Hund, 5 kg schwer, bekam pro Tag 6,7 g Stickstoff (100 g Brot und 1 Liter Milch). Lecithin wurde jeden zweiten Tag grammweise subkutan injiziert. Nach 8 Tagen stieg das Körpergewicht bis 6,9 kg. Die N- und P_2O_5-Ausscheidung im Harn stieg von 2,46 g auf 2,65 g und von 0,63 g auf 0,78 g.

Serono glaubt damit bewiesen zu haben, daß Lecithineinspritzungen das Körpergewicht steigern und zugleich die N- und P_2O_5-Ausscheidung vergrößern, aber so, daß die Ausgabe die Einnahme nicht übersteigt, somit der Stoffwechsel innerhalb der normalen Grenzen gesteigert ist.

Auf Grund der angegebenen Zahlen kann man aber die Resultate auch anders erklären. Beim zweiten Hunde liegt eine Übermästung vor, da im Anfange des Versuches von 6,7 g N nur 2,46 g N im Harn erscheinen. Das Körpergewicht steigt fast um 38 Proz. (?), die Stickstoffausscheidung im Harn jedoch nur um 8 Proz. Somit ist der Stoffwechsel, auf das Gewicht berechnet, vermindert und nicht gesteigert. Beim ersten Hunde steigt das Körpergewicht und die Stickstoffausscheidung im Harn um 18 bis 19 Proz. Hier ist somit der Stoffwechsel gleich geblieben. Leider macht der Verfasser keine Angaben über die Stickstoff- und P_2O_5-Ausscheidung mit dem Kot, so daß man nicht imstande ist, die wahre Bilanz zu berechnen.

Aly Zaky und Desgrez[3]) teilen einige Versuche an Meerschweinchen mit.

Die Tiere bekommen ad libitum Brot und Kohl. In 24 Stunden werden pro Kilogramm 0,46 g N und P_2O_5 0,059 g ausgeschieden. Das Lecithin wird bei der einen Versuchsgruppe subkutan, in der anderen per os eingeführt. Im ersten Falle beträgt die Ausscheidung 0,57 g N und 0,51 g P_2O_5, im zweiten 0,52 g N und 0,034 g P_2O_5. Ein analoger Versuch wird an einem Hunde

gemacht. Nach Lecithinzufuhr steigt die N-Ausscheidung von 0,28 g auf 0,41 g (pro 24 Stunden und Kilogramm berechnet).

Die Autoren schreiben danach dem Lecithin eine Vermehrung der N-Ausscheidung zu. Es ist aber auch möglich, daß unter dem Einfluß des Lecithins Appetit und Nahrungsaufnahme gesteigert waren. Zuverlässigere Zahlen sind von Aly Zaky[5]) in einer anderen Arbeit mitgeteilt.

Der Autor bestimmte die Ausscheidung von Gesamtstickstoff, Harnstoff, Phosphorsäure und Harnsäure bei einem Manne (64 kg schwer), welcher täglich 500 g Brot, 400 g Fleisch, 4 Eier (?) und 50 g Butter bekam. Während der Lecithinperiode wurden 0,3 g Lecithin eingeführt. Es wurden folgende Werte erhalten.

	Vorperiode (Mittel von 6 Tagen)	Lecithinperiode (Mittel von 8 Tagen)
Harnmenge	1306 ccm	1403 ccm
Gesamt-N	19,63 g	20,16 g
N des Harnstoffs	16,75 „	17,67 „
Gesamt-P_2O_5	2,92 „	2,70 „
Harnsäure	0,60 „	0,46 „

Leider teilt der Verfasser keine Werte über die Ausnutzung der Nahrung mit, so daß aus der Tabelle, was den Stickstoff und Harnstoff betrifft, kein sicherer Schluß zu ziehen ist. Die Menge der Xanthinkörper und der Phosphorsäure in der Nahrung und die Ausnutzung derselben ist ziemlich konstant, so daß es möglich ist, eine Verminderung der Phosphorsäure- und Harnsäureausscheidung anzunehmen.

Aly Zaky[4]) gibt noch zwei Versuche über die Harnsäureausscheidung unter dem Einfluß von Lecithin. Die Zusammensetzung der Nahrung wird nicht angegeben, es wird aber bemerkt, daß sie während des Versuches gleich blieb.

Frau (an Neurasthenie leidend). Die Harnsäureausscheidung pro Tag betrug in der

Nr. des Tages	Vorperiode g	Nr. des Tages	Lecithinperiode g
1	0,49	4	0,28
2	0,43	5	0,32
3	0,41	6	0,38
Mittel	0,443	Mittel	0.327

Mann, 24 Jahre alt (Lungentuberkulose). Die tägliche Ausscheidung der Harnsäure betrug in der

Nr. des Tages	Vorperiode g	Nr. des Tages	Lecithinperiode g
1	0,74	6	0,90
2	0,98	7	0,96
3	1,13	8	0,52
4	0,98	9	0,59
5	0,99	10	0,53
—	—	11	0,72
—	—	12	0,62
Mittel	0,964	Mittel	0,691

Die beiden Versuche zeigen eine Verminderung der Harnsäureausscheidung unter dem Einfluß des Lecithins.

Ferner führen Claude und Aly Zaky[5]) Beobachtungen über die Wirkung des Lecithins bei Lungentuberkulose an.

Junger Mann, 24 Jahre alt, Lungentuberkulose mit Kavernenbildung. Die Ausscheidung pro Tag beträgt 15,82 g N, 3,30 g P_2O_5, 12,56 g Harnstoff-N. Während der Lecithintherapie steigt das Körpergewicht auf 5,5 kg. Die Ausscheidung des Gesamt-N beträgt 16,06 g, des Harnstoff-N 13,51 g und der P_2O_5 2,69 g.

Bei einem anderen Kranken mit Lungentuberkulose und Gefäßsklerose bessert sich nach Lecithineinführung während 6 Tagen der Appetit, und das Körpergewicht steigt um 900 g. Während der Vorperiode ist die Ausscheidung des Gesamt-N 19,43 g, des Harnstoff-N 15,66 g, der P_2O_5 3,31 g. Während der Lecithinzufuhr ist die Ausscheidung des Gesamt-N 19,78 g, des Harnstoff-N 17,27 g und der P_2O_5 2,88 g.

In beiden Fällen sieht man eine Verminderung der P_2O_5-Ausscheidung eintreten. Da aber keine Angaben über die Nahrungsaufnahme vorliegen, so kann man die Vergrößerung der N-Ausscheidung auch durch einen vergrößerten Eiweißzerfall oder durch Steigerung des Appetits bzw. der Nahrungsaufnahme erklären.

Ein gewisses Interesse bietet der Selbstversuch von Morischau Beauchamp[6]).

Die Versuchsperson bekam während des ganzen Versuches dieselbe Kost, während der Lecithinperiode überdies 0,5 bis 1,0 g Lecithin pro Tag. Nach 3 bis 4 Tagen fühlte sich der Verfasser stärker. Sein Körpergewicht stieg um 900 g. Die Harnuntersuchung ergab folgende Werte (Mittelzahlen):

	Vorperiode g	Lecithinperiode g
Harnmenge	1080	940
Spez. Gewicht	1019	1030
Trockensubstanz	78,12	57,72
Organische Substanz	52,748	41,45
Anorganische Substanz	25,38	16,26
Gesamt-N	19,62	16,78
Harnsäure	1,44	0,81
Cl Na	18,44	8,95
P_2O_5	2,34	2,47
Harnstoff-N	15,01	13,76

Ein analoger Versuch ist an einem Stud. med. angestellt.

	Vorperiode g	Lecithinperiode g
Harnmenge	1200	800
Spez. Gewicht	1034	1030
Trockensubstanz	94,56	46,88
Organische Substanz	70,44	30,72
Anorganische Substanz	24,12	16,16
Gesamt-N	28,66	13,54
Harnstoff-N	21,79	10,82
Harnsäure	1,68	0,80
Cl Na	13,44	11,20
P_2O_5	3,54	1,68

Aus den angegebenen Werten ergibt sich eine Verminderung des Stickstoffs, des Harnstoffs, der Phosphorsäure und der Xanthinkörper im Harn unter dem Einfluß von Lecithin. Leider sind auch hier keine Zahlen über Zusammensetzung von Nahrung und Kot angegeben.

Am sorgfältigsten ist ein Versuch von Massaciu[7]) durchgeführt.

Ein 25 jähriger Mann, an katarrhalischer Pneumonie leidend, bekam pro Tag 200 g Fleisch, 2 Brötchen, 250 g Brot, 1 Liter Milch, 1 Liter Wasser, 2 Milchsuppen, 50 g Wurst, 100 g Butter, 4 Eiereiweiß und 60 g Zucker. Körpergewicht 60,8 kg. Der Versuch umfaßt vier Perioden.

Die Vorperiode dauerte 5 Tage. Die N-Einnahme betrug 87,9 g, die N-Ausscheidung 79,4 g (66,6 im Harn und 12,8 im Kot). Die N-Retention war also 8,5 g oder 1,7 g pro Tag. Die Harnmenge betrug 1184 ccm pro 24 Stunden, das spez. Gewicht 1,027. Die P_2O_5-Ausscheidung im Harn betrug 13,11, im Kot 5,8 g.

Während der zweiten Periode, welche 4 Tage dauerte, bekam die Versuchsperson anstatt Fleisch 50 g Roborat (darin etwa 0,5 g Lecithin). Die N-Einnahme betrug 82,4 g, die N-Ausscheidung 58,8 g (52,1 g im Harn und

6,8 g im Kot). Die N-Retention belief sich auf 23,6 g oder 5,9 g pro Tag. Die Harnmenge war 1510 ccm (spez. Gew. 1018). Die P_2O_5-Ausscheidung betrug 11,46 g im Harn und 3,8 g im Kot.

Während der dritten Periode (4 Tage) bekam der Kranke die Nahrung der zweiten Periode mehr 50 g Roborat. N-Einnahme 110,0 g, die N-Ausscheidung 99,1 g (65,5 g im Harn und 13,6 g im Kot). N-Retention: 35,6 g oder 8,9 g pro Tag. Harnmenge 1286 ccm (spez. Gew. 1022). Die P_2O_5-Ausscheidung im Harn 13,46 g, im Kot 7,60 g.

Die vierte Periode dauerte 4 Tage. Nahrung wie in der ersten Periode + 0,5 g Lecithin pro Tag. N-Einnahme 153,86 g, N-Ausscheidung 106,71 g (98,8 g im Harn und 7,91 g im Kot). N-Ansatz 47,15 g oder 6,73 g pro Tag. P_2O_5-Ausscheidung im Harn 20,3 g, im Kot 2,32 g.

Die Lecithinzufuhr oder der Zusatz von Lecithalbumin (Roborat) zu der gewöhnlichen Nahrung steigert sonach den Stickstoffansatz. Massaciu betont mit Recht, daß die gleichzeitige Einführung von Lecithin und Eiweiß einen besseren Eiweißansatz hervorruft — als Zufuhr reinen Eiweißes. Was aber die Form der Eiweißretention betrifft, so kann darüber nichts Bestimmtes ausgesagt werden, da keine genaueren Angaben über den P_2O_5-Wechsel vorliegen.

Schon ein Jahr vor Massacius Arbeit erschien eine russische Arbeit von Iliin[8]) über die Wirkung der organischen Phosphorverbindungen auf den Stickstoffansatz. Leider schwankte die Nahrung während des Versuches so bedeutend, daß es unmöglich ist, die Resultate mit Sicherheit auf den Lecithineinfluß zurückzuführen.

Um die Literaturangaben möglichst vollständig zu gestalten, sei noch eine Arbeit von Müller und Cronheim[9]) erwähnt.

Die Autoren stellten ihre Versuche an gesunden Kindern an, welche periodenweise mit Kindermehl oder mit Kindermehl und Eidotter gefüttert wurden. In nachstehender Tabelle ist der N- und P_2O_5-Ansatz, pro Tag und Kilo Gewicht berechnet, nach ihren Angaben zusammengestellt.

	Kontrollperiode		Lecithinperiode	
	N g	P_2O_5 g	N g	P_2O_5 g
Kind 3 (4 Monate)	0,216	0,274	0,242	0,168
Kind 5 (4½ Monate)	0,574	0,036	0,553	0,031
Kind 6 (5 Monate)	0,499	0,239	0,469	0,167
Mittel	0,429	0,183	0,421	0,122
Kind 2 (11 Monate)	0,241	0,185	0,690	0,360
Kind 4 (6 Monate)	0,009	0,721	0,964	9,559
	—	—	0,246	0,321
Mittel	0,625	0,453	0,633	0,543
Kind (2½ Jahre)	0,051	0,429	0,638	0,518

Der Lecithinzusatz hat eine günstige Wirkung auf den N- und P_2O_5-Ansatz. Sie ist bei ganz kleinen Kindern fast unmerklich, tritt aber umso deutlicher hervor, je größer die Versuchskinder sind.

Dieser Unterschied wird, wie mir scheint, durch eine von Dr. Siwertzeff[10]) festgestellte Tatsache erklärt. Im menschlichen Organismus besteht danach bei der Geburt ein Lecithinvorrat, welcher dann allmählich während 4 bis 5 Monaten verbraucht wird. Ist diese Angabe richtig, so ist verständlich, daß für obigen Versuch ganz kleine Kinder ein ungünstiges Objekt darstellen, da bei ihnen während der Kontrollperioden noch der Lecithinvorrat mitbeteiligt ist und somit der Unterschied zwischen den Kontroll- und Lecithinperioden nicht so stark hervortreten kann.

2.

Bei Vergleich der vorliegenden Beobachtungen sehen wir, daß bei den meisten eingehender durchgeführten Versuchen unter dem Einfluß des Lecithins eine Stickstoff-Retention eintritt. In den Fällen, wo während der Lecithinperioden eine vermehrte N-Ausscheidung im Harn festgestellt ist, kann man andere Ursachen (vermehrte Nahrungsaufnahme, Gewichtszunahme) zur Erklärung heranziehen. Parallel dem N-Ansatz geht eine verminderte P_2O_5-Ausscheidung im Harn und eine Verminderung der Xanthinkörperausscheidung.

Meine Versuche verfolgten den Zweck, die erwähnten Tatsachen nochmal zu prüfen und genauer festzustellen, ob der N-Ansatz dem Eiweißansatz entspricht und welche Form des im Harn ausgeschiedenen Stickstoffs sich unter dem Lecithineinfluß vermindert.

Um meine Resultate möglichst einwandfrei zu machen, habe ich die N- und P_2O_5-Einnahme während der verschiedenen Perioden möglichst genau verglichen und in derselben Zeit auch die Kalorienzufuhr und den Kohlehydrat- und Fettgehalt der Nahrung (pro Periode) gleich gemacht. Wählt man statt Lecithin eine lecithinhaltige Nahrung, so ist man nicht imstande, den gleichen Gehalt an Fett, Kohlehydrat, Eiweiß und Kalorien in der Nahrung festzuhalten. Bei fettreicher Nahrung neigt der Organismus dazu, in erster Linie Fett oder Kohlehydrat zu verbrennen und Eiweiß zu sparen, und man vermag nicht zu entscheiden, ob der Eiweißansatz durch Lecithin oder durch Veränderung der Nahrung bedingt ist.

Nachstehend bin ich in der Lage, zwei vollständige und einen kürzeren Versuch anzuführen. Ich hoffe, daß die übereinstimmenden

Resultate im Zusammenhalt mit den Arbeiten der anderen Autoren mich berechtigen, eine Meinung über den Chemismus der Lecithinwirkung auszusprechen.

Versuch Nr. 1.

Die Versuchsperson, Diener T. S., 27 Jahre alt, 61,51 kg schwer, ganz gesund, bekam während des Versuches pro 24 Stunden 825 g Schwarzbrot, 700 ccm Milch, 60 g Butter und 215 g Fleisch (etwa 5 g ClNa), was nach Rubners Tabellen 2809 Kalorien ausmacht. Die Wasseraufnahme betrug 1200 bis 1500 ccm. Der Versuch dauerte 18 Tage. Davon fallen die ersten Tage weg, da sich während dieser Periode das Stickstoffgleichgewicht einstellte. 13 Tage wurden in drei Perioden geteilt (5 Tage Vorperiode, 4 Tage Lecithinperiode und 4 Tage Nachperiode). Die Kotabgrenzung wurde mit Kohlenpulver vorgenommen. Die Harnuntersuchung wurde pro Tag, die Kotanalyse und die Analyse der Nahrung pro Periode durchgeführt.

Aus Tabelle II (a. f. S.) ersieht man, daß die mittlere Stickstoffeinnahme pro 24 Stunden während der verschiedenen Perioden ziemlich gleich war (1. 21,202 g, 2. 22,278 g, 3. 22,381 g). Davon wurden 18,097 g, 19,940 g und 19,907 g resorbiert. Die N-Ausscheidung im Harn betrug 18,223, 15,218 und 17,692 g. Somit beträgt der N-Ansatz in der Vorperiode pro Tag 2,979 g, in der Lecithinperiode 7,160 g und in der Nachperiode 3,739 g. Lecithin wirkt also bei derselben Nahrung günstig auf den Stoffwechsel. Der Ansatz steigt während der Lecithinperiode fast um 4 g (3,98 g). Diese günstige Wirkung hält auch während der Nachperiode an.

Parallel dem Stickstoffansatz findet auch eine P_2O_5-Retention statt. Die Tabelle III zeigt, daß aus 4,416, 4,757 und 4,553 g P_2O_5 der Nahrung während der Vorperiode nur 0,678 g retiniert werden. Nach Lecithindarreichung steigt die P_2O_5-Retention bis 1,265 g und während der Nachperiode auf 0,752 g.

Die P_2O_5-Retention bezieht sich hauptsächlich auf die Gesamt-P_2O_5 des Harnes, da die Ausscheidung des phosphorsauren Calciums und Magnesiums nicht verändert wird. Die Ausscheidung von Ca und Mg im Harn verändert sich periodenweise, ohne daß es möglich wäre, für diese Veränderungen eine Erklärung zu geben. Wir sehen ferner, daß der P_2O_5-Retention eine Verminderung der SO_3-Ausscheidung parallel geht (Tabelle IV), von 2,122 g pro Tag auf 1,867 g und 2,228 g SO_3. Die ClNa-Ausscheidung im Harn steigt während der Lecithin- und Nachperiode bedeutend.

Die Verminderung der N-Ausscheidung im Harn (Tabelle V) von 15,119 g auf 12,98 g während der Lecithinperiode steht im Zusammenhang mit der Verminderung der Harnstoffausscheidung (von 12,422 g N auf 10,602 g). Man bemerkt auch eine Verminderung des Xanthinkörper-N von 0,114 g auf 0,0988 und 0,0768 g. Die Menge des Kreatinins im Harne und des Reststickstoffs scheint sich nicht zu verändern, jene des Ammoniaks scheint zu steigen.

Versuch Nr. 2.

Diesen Versuch habe ich an mir selbst angestellt. Körpergewicht 76,4 kg. Gesundheit normal. Die Nahrung bestand aus Brot, Fleisch, Milch und Butter. Während einiger Tage fügte ich etwas Makkaroni und Grütze

Tabelle II.

Monat und Tag 1905	Tag des Versuches	Gewicht	Einnahme: Brot		Fleisch		Milch		Butter und Lecithin		Gesamt-N	Ausgabe: N in Kot	N in Harn	Gesamt-N	Bilanz: N retiniert	N resorbiert
		kg	g	N g	g	N g	ccm	N g	g	N g	g	g	g	g	g	g
27. Juli	2	61,53	633	9,202	205	6,36	690	3,284	60	0,153	—		19,900	—	—	—
28. „	3	61,53	825	11,992	205	6,36	690	3,284	60	0,153	—		15,029	—	—	—
29. „	4	61,53	825	11,992	205	6,36	690	3,284	60	0,153	—	15,522	13,544	—	—	—
30. „	5	61,53	825	11,992	205	6,36	690	3,284	60	0,153	—		15,268	—	—	—
31. „	6	61,53	815	11,847	205	6,36	690	3,284	60	0,153	—		11,885	—	—	—
Mittel		**61,53**	**784,6**	**11,405**	**205**	**6,36**	**690**	**3,284**	**60**	**0,153**	**21,202**	**3,104**	**15,119**	**18,223**	**2,979**	**18,098**
1. August	7	61,51	825	11,880	215	6,999	690	3,207	88 + 2	0,192	—		10,702	—	—	—
2. „	8	61,51	825	11,880	215	6,999	690	3,207	58 + 2	0,192	—	8,954	16,888	—	—	—
3. „	9	61,51	825	11,880	215	6,999	690	3,207	58 + 2	0,192	—		14,000	—	—	—
4. „	10	61,51	825	11,880	215	6,999	690	3,207	58 + 2	0,192	—		13,332	—	—	—
Mittel		**61,51**	**825**	**11,880**	**215**	**6,999**	**690**	**3,207**	**58 + 2**	**0,192**	**22,278**	**2,238**	**12,980**	**15,218**	**7,160**	**19,940**
5. August	11	61,51	825	11,848	215	7,096	690	3,284	60	0,153	—		16,156	—	—	—
6. „	12	61,51	825	11,848	215	7,096	690	3,284	60	0,153	—	9,896	12,992	—	—	—
7. „	13	61,51	825	11,848	215	7,096	690	3,284	60	0,153	—		15,800	—	—	—
8. „	14	61,51	825	11,848	215	7,096	690	3,284	60	0,153	—		15,725	—	—	—
Mittel		**61,51**	**825**	**11,848**	**215**	**7,096**	**690**	**3,284**	**60**	**0,153**	**22,381**	**2,474**	**15,168**	**17,642**	**4,739**	**19,907**

Tabelle III.

Nr. der Periode	Einnahme: Brot		Fleisch		Milch		Butter und Lecithin		Gesamt-P_2O_5	Ausgabe: Kot		Harn		Gesamt-P_2O_5	P_2O_5 resorbiert	P_2O_5 retiniert
	g	P_2O_5 g	g	P_2O_5 g	ccm	P_2O_5 g	g	P_2O_5 g	g	g	P_2O_5 g	ccm	P_2O_5 g	g	g	g
1	784,6	2,699	205	0,779	690	0,914	60	0 024	4,416	375	0,943	1042	2,795	3,738	3,473	+ 0,678
2	825,0	2,707	215	0,702	690	1,276	58 + 2 Lec.	0,072	4,757	425	0,964	1160	2,528	3,492	3,793	+ 1,265
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	1,116	1152	2,685	3,801	3,437	+ 0,752

Tabelle IV.

Tag des Versuches	Harnmenge	Trockensubstanz		Gesamt-P_2O_5		P_2O_5 an Ca u. Mg gebunden		Gesamt-ClNa		Gesamt-SO_3		Gesamt-CaO		Gesamt-MgO	
	ccm	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g
2	1150	—	—	0,261	3,001	0,120	1,380	1,02	11,730	0,173	1,989	—	—	—	—
3	1130	—	—	0,243	2,746	0,125	1,412	0,75	7,475	0,209	2,362	—	—	—	—
4	870	—	—	0,353	3,071	0,115	1,000	0,92	8,004	0,201	1,749	—	—	—	—
5	1330	—	—	0,193	2,567	0,100	1,330	0,62	8,246	0,158	2,101	—	—	—	—
6	730	—	—	0,355	2,591	0,140	1,022	0,95	6,935	0,330	2,409	—	—	—	—
Mittel	1042	3,606	47,57	0,281	2,795	0,120	1,229	0,852	8,678	0,216	2,122	0,022	0,229	0,0163	0,170
7	1470	—	—	0,166	2,440	0,080	1,176	0,62	9,114	0,108	1,588	—	—	—	—
8	1240	—	—	0,215	2,666	0,100	1,240	1,00	12,400	0,177	2,195	—	—	—	—
9	1000	—	—	0,245	2,450	0,130	1,300	1,20	12,00	0,177	1,770	—	—	—	—
10	930	—	—	0,275	2,557	0,120	1,116	1,42	13,206	0,206	1,916	—	—	—	—
Mittel	1160	3,920	45,47	0,223	2,528	0,108	1,208	1,06	11,930	0,167	1,867	0,0235	0,272	0,0118	0,136
11	1400	—	—	0,200	2,800	0,130	1,820	0,80	11,200	0,179	2,506	—	—	—	—
12	800	—	—	0,340	2,720	0,130	1,040	1,02	8,160	0,240	1,920	—	—	—	—
13	1330	—	—	0,165	2,194	0,070	0,931	0,85	11,305	0,165	2,105	—	—	—	—
14	1080	—	—	0,280	3,024	0,120	1,296	1,10	11,880	0,213	2,290	—	—	—	—
Mittel	1152	3,780	43,54	0,246	2,685	0,112	1,272	0,84	10,636	0,199	2,228	0,0225	0,259	0,0104	0,106

Tabelle V.

Tag und Monat	Tag des Versuches	Harnmenge	Spez. Gewicht	Gesamt-N (n. Kjeldahl)		N des Harnstoffs (nach Mörner-Siöquist)		N des NH_3 (nach Folin)		N der Xanthinkörper (n. Sulkowsky)		Reststickstoff		N des Kreatinins (n. Djonson)	
		ccm		Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g
27. Juli	2	1150	1022	1,730	19,900	1,420	16,330	0,0112	0,1288	0,0140	0,1610	0,2852	3,2798	—	—
28. „	3	1130	1020	1,330	15,029	1,148	12,972	0,0112	0,1266	0,0112	0,1266	0,1596	1,8035	—	—
29. „	4	870	1018	1,557	13,544	1,200	10,440	0,0146	0,1270	0,0118	0,1027	0,3306	2,8762	—	—
30. „	5	1330	1015	1,148	15,268	0,953	12,675	0,0110	0,1463	0,0092	0,1224	0,1748	2,3248	—	—
31. „	6	730	1020	1,624	11,855	1,328	9,694	0,0124	0,0905	0,0106	0,0774	0,2730	1,9929	—	—
Mittel		**1042**	**1019**	**1,478**	**15,119**	**1,210**	**12,422**	**0,0121**	**0,1238**	**0,0114**	**0,1140**	**0,2446**	**2,4492**	**0,0252**	**0,2726**
1. Aug.	7	1470	1012	0,728	10,702	0,544	7,997	0,0124	0,1823	0,0092	0,1352	0,1614	2,3726	—	—
2. „	8	1240	1020	1,120	13,888	0,973	12,065	0,0112	0,1389	0,0106	0,1314	0,1252	1,5525	—	—
3. „	9	1000	1020	1,400	14,000	1,089	10,830	0,0124	0,1240	0,0056	0,0560	0,2930	2,9300	—	—
4. „	10	930	1022	1,434	13,332	1,232	11,458	0,0224	0,2083	0,0078	0,0725	0,1718	1,5987	—	—
Mittel		**1160**	**1018**	**1,170**	**12,980**	**0,956**	**10,602**	**0,0117**	**0,1784**	**0,0083**	**0,0988**	**0,1878**	**2,1108**	**0,0210**	**0,2436**
5. Aug.	11	1400	1018	1,154	16,156	0,974	13,636	0,0200	0,2800	0,0056	0,0784	0,1546	2,1644	—	—
6. „	12	800	1020	1,624	12,992	1,226	9,808	0,0240	0,1920	0,0073	0,0584	0,3667	2,9336	—	—
7. „	13	1330	1015	1,188	15,800	0,917	12,196	0,0210	0,2793	0,0067	0,0891	0,2433	3,2359	—	—
8. „	14	1080	1020	1,456	15,725	1,261	13,619	0,0220	0,2376	0,0073	0,0788	0,1657	1,7896	—	—
Mittel		**1152**	**1018**	**1,355**	**15,168**	**1,094**	**12,319**	**0,0218**	**0,2472**	**0,0067**	**0,0762**	**0,2451**	**2,5309**	**0,0210**	**0,2415**

Tabelle VI.

Tag des Versuches	Körpergewicht	Brot		Fleisch		Milch und Tee		Mehl		Makkaroni und Grütze		Butter und Lecithin		Zucker und Käse		Gesamt-N
	kg	g	N g	g	N g	ccm	N g	g	N g	g	N g	g	N g	g	N g	g
1	76,4	368,8	7,17	218,2	9,72	500 800	2,52 0,05	21,3	0,43	102,2 M.	2,22	75,7	0,08	52,1	—	—
2	76,4	368,8	7,17	218,2	9,72	500 800	2,52 0,05	21,3	0,43	102,2 „	2,22	55,4	0,06	52,1	—	—
3	76,4	305,2	5,97	218,2	9,72	750 1200	3,75 0,07	21,3	0,43	51,1 G.	1,46	55,4	0,06	95,2	—	—
Mittel	76,4	347,6	6,77	218,2	9,72	583 933	2,99	21,3	0,43	—	1,97	62,2	0,07	88,5	—	21,95
4	76,4	347,1	6,79	213,0	9,59	500 900	2,52 0,06	17,3	0,34	102,2 M.	2,22	76,9	0,08	85,2 + 34,3	0,72	—
5	76,4	221,5	4,33	213,0	11,50	500 900	2,52 0,06	17,3	0,34	102,2 „	2,22	52,4	0,06	89,5 + 26,6	+ 0,54	—
6	76,4	430,2	7,41	213,0	9,59	600 1200	3,00 0,07	—	—	51,1 G.	1,46	33,0	0,05	63,9	—	—
Mittel	76,4	332,9	6,18	213,0	10,23	533 1000	2,74	11,5	0,21	—	1,97	53,8	0,06	—	0,32	21,82

Tabelle VII.

Tag des Versuches	Stickstoff-einnahme	Stickstoffausfuhr				Gesamt-N	N-Ansatz
		Kot		Harn			
	g	Proz.	g	ccm	g	g	g
1	22,19			1400	19,36	—	—
2	22,19	1400	10,96	1250	15,89	—	—
3	21,46			1100	15,71	—	—
Mittel	21,95	467	3,65	1250	16,98	20,63	+ 1,32
4	22,32			1100	17,86	—	—
5	21,57	1290	8,73	950	15,02	—	—
6	21,58			1200	17,43	—	—
Mittel	21,82	430	2,91	1083	16,78	19,69	+ 2,13

Tabelle VIII.

Tag des Versuches	P_2O_5-Einnahme	P_2O_5-Ausfuhr				Gesamtabgabe an P_2O_5	P_2O_5-Ansatz
		Kot		Harn			
	g	g	P_2O_5 g	ccm	P_2O_5 g	g	g
1	4,56			1400	3,29	—	—
2	4,56	1400	2,286	1250	2,69	—	—
3	4,41			1100	2,77	—	—
Mittel	4,51	467	0,76	1250	2,92	3,68	+ 0,83
4	4,92			1100	3,24	—	—
5	4,33	1290	2,038	950	2,42	—	—
6	4,75			1200	2,82	—	—
Mittel	4,67	430	0,68	1083	2,83	3,51	+ 1,16

hinzu. Vor dem Versuche blieb ich etwa eine Woche auf solcher Nahrung. Der Versuch selbst sollte 9 Tage dauern (3 Tage pro Periode). Leider ist die Nachperiode wegen Unwohlseins verloren gegangen.

Obgleich die Nahrung ziemlich wechselte, blieb die tägliche Stickstoffeinfuhr während der ersten und zweiten Periode gleich, 21,95 und 21,82 g. Die Lecithinaufnahme betrug 0,5 g pro Tag, doch genügte diese Menge, einen besseren Ansatz hervorzurufen und ihn von 1,32 g pro die auf 2,13 g zu steigern.

Parallel dem N-Ansatz geht eine P_2O_5-Retention, die allerdings ziemlich klein ist. Anstatt + 0,83 g 1,16 g P_2O_5.

Die Veränderung der P_2O_5-Ausscheidung im Harn betrifft die Ca- und Mg-Salze. Die ClNa-Ausscheidung ist vermindert. Die Schwefelsäureausscheidung im Harn sinkt von 2,82 auf 2,42 g.

Tag des Versuches	Harnmenge ccm	Gesamt-N Proz.	Gesamt-N pro 24 Std. g	N des Harnstoffs Proz.	N des Harnstoffs pro 24 Std. g	N der Xanthinkörper Proz.	N der Xanthinkörper pro 24 Std. g	N des Ammoniaks Proz.	N des Ammoniaks pro 24 Std. g	Rest-N Proz.	Rest-N pro 24 Std. g	N des Kreatinins Proz.	N des Kreatinins pro 24 Std. g
1	1400	1,383	19,362	1,175	16,450	0,0112	0,1568	0,025	0,350	0,172	2,400	—	—
2	1250	1,271	15,887	0,804	10,046	0,0104	0,1300	0,022	0,275	0,435	5,436	—	—
3	1100	1,428	15,700	0,918	10,098	0,0104	0,1144	0,025	0,275	0,475	5,213	—	—
Mittel	1250	1,361	**16,983**	0,966	**12,198**	0,0106	**0,1337**	0,024	**0,300**	0,361	**4,353**	0,019	**0,237**
1	1100	1,624	17,864	0,939	10,329	0,0076	0,0836	0,025	0,275	0,652	4,176	—	—
2	950	1,582	15,023	0,900	8,550	0,0104	0,0988	0,028	0,266	0,644	6,114	—	—
3	1200	1,456	17,472	0,864	10,368	0,0076	0,0912	0,025	0,300	0,759	6,713	—	—
Mittel	1083	1,510	**16,788**	0,901	**9,749**	0,085	**0,0912**	0,026	**0,280**	0,685	**6,997**	0,021	**0,227**

Tabelle X.

Tag des Versuches	Harnmenge ccm	Spezifisches Gewicht	Gesamt-P_2O_5 Proz.	Gesamt-P_2O_5 pro 24 Std. g	P_2O_5 (an Ca u. Mg gebunden) Proz.	P_2O_5 (an Ca u. Mg gebunden) pro 24 Std. g	ClNa Proz.	ClNa pro 24 Std. g	SO_3 Proz.	SO_3 pro 24 Std. g	CaO Proz.	CaO pro 24 Std. g	MgO Proz.	MgO pro 24 Std. g
1	1400	1017	0,235	3,29	0,135	1,89	0,92	12,88	0,21	2,94	—	—	—	—
2	1250	1018	0,215	2,69	0,115	1,44	0,94	11,71	0,23	2,87	—	—	—	—
3	1100	1018	0,252	2,77	0,125	1,38	1,10	12,10	0,24	2,64	—	—	—	—
Mittel	1250	1018	0,234	**2,92**	0,125	**1,57**	0,99	**12,23**	0,23	**2,82**	0,017	**0,212**	0,016	**0,200**
4	1100	1020	0,295	3,24	0,130	1,43	0,86	9,46	0,22	2,42	—	—	—	—
5	950	1022	0,255	2,42	0,125	1,19	1,25	11,87	0,23	2,18	—	—	—	—
6	1200	1018	0,235	2,82	0,115	1,38	0,89	10,48	0,22	2,42	—	—	—	—
Mittel	1083	1020	0,262	**2,83**	0,123	**1,33**	1,00	**10,60**	0,22	**2,32**	0,018	0,189	0,017	0,174

Was die Verteilung des Stickstoffs im Harn betrifft, so sehen wir eine Verminderung der Harnstoffausscheidung, obgleich die Gesamt-N-Ausscheidung nur unbedeutend sinkt. Die Kreatinin- und Ammoniakmenge scheint sich nicht zu vermindern, die Xanthinkörperausscheidung sinkt von 0,1337 g N auf 0,0912 g. Der Reststickstoff ist vermehrt.

Obgleich dieser Versuch nicht so sorgfältig durchgeführt ist als der erste, so ergibt er doch für einige Tatsachen Übereinstimmung mit dem ersten Versuch.

Versuch Nr. 3.

Laboratoriumsdiener N., 18 Jahre alt, 47 kg schwer, bekommt während des Versuches Schwarzbrot, Fleisch, Milch und Butter, während der viertägigen Lecithinperiode überdies $1^1/_2$ g Lecithin. Die Mittelwerte für die täglichen N-Einnahmen betragen 17,62 bis 16,72 g und das kalorische Äquivalent der Nahrung etwa 2400 Kalorien.

Die N-Einfuhr pro 24 Stunden betrug im Mittel 17,624, 17,567 und 16,820 g. Davon wurden 12,404, 11,745 und 12,633 g mit dem Harn und 3,71, 3,93 und 3,98 g mit dem Kot ausgeschieden. Der N-Ansatz ist also während der Vorperiode 0,494, während der Lecithinperiode 1,892 g und während der Nachperiode 0,207 g. (Tabelle XI.)

Parallel dem N-Ansatz geht auch die P_2O_5-Retention. Gegen 4,54, 4,54 und 4,46 g P_2O_5 werden 3,71, 347 und 3,73 g ausgeschieden. Der P_2O_5-Ansatz beträgt also während der ersten Periode + 0,83, während der Lecithinperiode + 1,07 g, während der Nachperiode + 0,73 g (Tabelle XII). Diese P_2O_5-Retention bezieht sich hauptsächlich auf den Gesamt-P_2O_5. Die ClNa-Ausscheidung ist vermehrt. Der CaO- und MgO-Gehalt des Harnes bleibt ziemlich konstant, und die SO_3-Ausscheidung sinkt von 2,02 pro Tag auf 1,79 g.

Die N-Verminderung im Harn bezieht sich hauptsächlich auf den Harnstoff. Der Kreatiningehalt und die Ammoniakmenge bleibt unverändert. Der Stickstoff der Xanthinkörper sinkt von 0,225 g auf 0,189 g und 0,197 g pro Tag. Der Rest-N steigt nur während der Nachperiode.

In allen drei Versuchen sieht man deutlich folgende Wirkung des Lecithins auf den Stoffwechsel:

Stickstoff-Retention von Verminderung der Schwefelsäureausscheidung im Harn begleitet. Da die Schwefelsäureausscheidung im Harn mit dem Zerfalle der Eiweißkörper im Zusammenhang steht, so scheinen mir die beiden Tatsachen zu beweisen, daß wirklich eine Eiweißretention, nicht aber eine Retention von anderen stickstoffhaltigen Produkten (Extraktivstoffen) vorliegt.

Der Eiweißansatz geht mit P_2O_5-Ansatz und Verminderung des Eiweißstickstoffs einher. Diese Erscheinung zeigt, daß das Lecithin die Organisation des Eiweißes, das heißt seine Umwandlung in Gewebeeiweiß befördert. Voit nimmt an, daß das resorbierte Eiweiß im Organismus in zwei Formen gefunden wird, als zirkulierendes und als Organeiweiß. Die Arbeit von Umikoff[11])

Tabelle XI.

Tag im März	Tag des Versuches	Körpergewicht kg	Brot g	Brot N g	Fleisch g	Fleisch N g	Milch ccm	Milch N g	Butter und Lecithin g	Butter und Lecithin N g	Gesamt-N-Einnahme g	Harn ccm	Harn N g	Kot g	Kot N g	Gesamt-N-Abgabe g	N-Ansatz g
17.	1	47,0	845	8,074	220	9,966	700	2,268	60	—	—	950	16,438	—	—	—	—
18.	2	47,0	835	7,999	155	7,022	700	2,268	60	—	—	1000	14,280	972	—	—	—
19.	3	46,8	845	8,074	155	7,022	700	2,268	60	—	—	1900	12,852	—	—	—	—
20.	4	46,8	615	5.891	162	7,339	700	2,268	60	—	—	800	11,648	—	—	—	—
Mittel . . .		46,9	785	7,509	173	7,847	700	2,268	60	—	**17,624**	917,5	12,504	243	4,63	**16,214**	+ **0,494**
21.	5	46,9	700	6,706	162	7,339	700	2,268	59 + 1	0,021	—	800	10,176	—	—	—	—
22.	6	47,0	825	7,904	160	7,248	700	2,268	59 + 1	0,021	—	1600	12,264	920	—	—	—
23.	7	47,1	830	7,951	160	7,248	700	2,268	59 + 1	0,021	—	1500	11,760	—	—	—	—
24.	8	47,1	795	7,616	178	8,062	700	2,268	59 + 1	0,021	—	1500	12,780	—	—	—	—
Mittel . . .		47,0	788,5	7,554	165	7,724	700	2,268	59 + 1,5	0,021	**17,567**	1350	11,745	230	3,93	**15,675**	+ **1,892**
25.	9	47,0	830	7,951	160	7,248	700	2,268	60	—	—	1000	11,200	—	—	—	—
26.	10	47,0	834	7,999	160	7,248	700	2,268	60	—	—	1750	13,920	920	—	—	—
27.	11	46,8	580	5,566	155	7,022	700	2,268	48	—	—	1010	11,129	—	—	—	—
28.	12	47,0	830	7,951	155	7,022	700	2,268	48	—	—	1700	14,484	—	—	—	—
Mittel . . .		46,9	768,0	7,367	157,5	7,185	700	2,268	54,0	—	**16,820**	1365	12,633	230	3,98	**16,613**	+ **0,207**

Tabelle XII.

	Periode	P_2O_5-Einnahme: Brot g	Brot P_2O_5 g	Fleisch g	Fleisch P_2O_5 g	Milch ccm	Milch P_2O_5 g	Butter und Lecithin g	Butter und Lecithin P_2O_5 g	Gesamt-P_2O_5 g	P_2O_5-Ausfuhr: Kot g	Kot P_2O_5 g	Harn g	Harn P_2O_5 g	Gesamt-P_2O_5 g	P_2O_5-Ansatz g
Mittel	I	785	2,433	173	0,726	700	1,379	60,5	—	4,54	218	0,48	917,5	3,23	3,71	+ 0,83
"	II	788,5	2,443	165	0,693	700	1,379	58,5 + 1,5	0,03	4,54	230	0,34	1350	3,13	3,47	+ **1,07**
"	III	768,0	2,380	167,5	0,704	700	1,379	54,0	—	4,46	230	0,34	1365	3,39	3,73	+ 0,73

Tabelle XIII.

Tag des Versuches	Reaktion	Harn-menge	Spez. Gew.	Gesamt-N		N des Harnstoffs		N der Xanthinkörper		N des Ammoniaks		Rest-N		N des Kreatinins	
				Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g
1	Sauer	950	1017	1,204	11,438	0,882	8,379	0,023	0,218	0,020	0,190	0,279	2,750	—	—
2	Sauer	1000	1020	1,428	14,280	0,919	9,190	0,021	0,210	0,013	0,130	0,475	4,750	—	—
3	Sauer	900	1022	1,428	12,852	1,059	9,531	0,026	0,234	0,016	0,144	0,327	2,943	—	—
4	Sauer	800	1020	1,456	11,648	1,140	9,120	0,030	0,240	0,022	0,176	0,264	2,112	—	—
Mittel . . .		917,5	1020	1,379	**12,504**	1,000	**9,170**	0,025	**0,225**	0,018	**0,160**	0,346	**2,949**	0,028	**0,207**
5	Sauer	800	1022	1,272	10,176	0,883	7,064	0,018	0,144	0,017	0,136	0,461	3,688	—	—
6	Sauer	1600	1011	0,892	12,264	0,662	8,792	0,014	0,224	0,009	0 144	0,207	3,312	—	—
7	Sauer	1500	1013	0,784	11,760	0,604	9,060	0,013	0,195	0,011	0,165	0,156	2,340	—	—
8	Sauer	1500	1016	0,852	12,780	0,597	8,955	0,013	0,195	0,009	0,135	0,233	3,495	—	—
Mittel . . .		1350	1016	0,951	**11,745**	0,661	**8,477**	0,014	**0,189**	0,011	**0,152**	0,265	**2,927**	0,021	**0,283**
9	Sauer	1000	1020	1,120	11,200	0,908	9,080	0,017	0,170	0,011	0,110	0,184	1,840	—	—
10	Sauer	1750	1010	0,784	13,720	0,580	10,150	0,013	0,226	0,009	0,158	0,182	3,085	—	—
11	Sauer	1010	1020	1,092	11,129	0,744	7,514	0,018	0,181	0,012	0,121	0,318	3,212	—	—
12	Sauer	1700	1018	0,852	14,484	0,588	9,926	0,012	0,204	0,009	0,153	0,243	4,131	—	—
Mittel . . .		1365	1017	0,962	**12,633**	0,655	**8,872**	0,015	**0,197**	0,010	**0,146**	0,282	**3,418**	0,020	**0,272**

Tabelle XIV.

Tag des Versuches	Harnmenge	Spez. Gewicht	Gesamt-P_2O_5		P_2O_5 (mit Ca u. Mg gebunden)		ClNa		SO_3		CaO		MgO	
	ccm		Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g	Proz.	pro 24 Std. g
1	950	1017	0,380	3,25	0,170	1,61	1,25	11,87	0,207	1,97	—	—	—	—
2	1000	1020	0,295	2,95	0,155	1,55	1,30	13,00	0,210	2,10	—	—	—	—
3	900	1022	0,385	3,47	0,188	1,69	1,62	14,58	0,226	2,03	—	—	—	—
4	800	1022	0,405	3,24	0,210	1,68	1,30	10,40	0,248	1,98	—	—	—	—
Mittel	917,5	1020	0,366	3,23	0,181	1,63	1,37	12,46	0,223	2,02	0,021	0,193	0,017	0,156
5	800	1022	0,385	3,08	0,156	1,25	1,58	12,64	0,226	1,80	—	—	—	—
6	1600	1011	0,200	3,20	0,100	1,60	0,95	15,20	0,116	1,85	—	—	—	—
7	1500	1013	0,201	3,01	0,120	1,80	0,95	14,25	0,114	1,71	—	—	—	—
8	1500	1018	0,200	3,00	0,110	1,65	0,98	14,70	0,120	1,80	—	—	—	—
Mittel	1350,0	1016	0,246	3,13	0,121	1,58	1,12	13,95	0,141	1,79	0,016	0,216	0,012	0,162
9	1000,0	1020	0,320	3,20	0,190	1,90	1,10	11,00	0,205	2,05	—	—	—	—
10	1750,0	1010	0,210	3,67	0,100	1,75	0,90	15,75	0,113	1,98	—	—	—	—
11	1010	1020	0,325	3,28	0,150	1,51	1,12	11,31	0,216	2,13	—	—	—	—
12	1700	1018	0,200	3,40	0,100	1,75	0,85	14,45	0,115	1,95	—	—	—	—
Mittel	1365,0	1017	0,289	3,39	0,135	1,70	0,99	13,15	0,161	2,03	0,015	0,204	0,012	0,164

hat gezeigt, daß der Eiweißvorrat im Tierkörper in Muskelgewebe und Leber hauptsächlich in Form von Myosin und Myostromin angelagert wird. (Unter Myostromin verstehen Danilewski und seine Schüler phosphorhaltige Eiweißkörper, welche aus dem Muskel nach Myosinextraktion zurückbleiben und welche nach Zusammensetzung und Lösungsvermögen den Nukleoalbuminen ähnlich sind.) Später hat Slowtzoff[12]) gefunden, daß schon 24 Stunden nach Nahrungseinnahme ein Übergang von Myosin in Myostromin stattfindet. Wenn die Resultate von Umikoff und Slowtzoff richtig sind, so hat man sich den Übergang des resorbierten Eiweißes in organisiertes als eine Anreicherung desselben mit Phosphorsäure und Xanthinkörpern vorzustellen. Somit wäre die Wirkung des Lecithins günstig für diese Organisation, und es wäre verständlich, daß der Eiweißansatz von Xanthinkörper- und Phosphorsäureretention begleitet ist.

Literatur.

[1]) Selenski (nach Umikoff, siehe Nr. 11).
[2]) Serono, Arch. ital. de biol. 27, 349.
[3]) Aly Zaky und Desgrez, C. R. de l'Acad. des sciences 123, 1512 (1901).
[4]) Aly Zaky und Desgrez, C. R. de Soc. Biol. 52, 794 (1900).
[5]) Claude und Aly Zaky, Presse medic. 1901.
[6]) Morischau-Beauchamp, Etude therapeutique sur la lecithine. Thèse des Paris, 1901.
[7]) Massaciu, Deutsche mediz. Wochenschr. 1901.
[8]) Iliin, Wratsch 1901, Nr. 37 (russ.).
[9]) Cronheim und Müller, Zeitschr. f. diät. u. phys. Therap. 6, 1 (1902).
[10]) Siwertzeff, Vergleichender Lecithingehalt bei Kindern, 1903. Dissert. (russ.).
[11]) Umikoff, Über den Ort des physiologischen Eiweißvorrates. Phys. Studien von Gebrüder B. und A. Danilewski (russ.).
[12]) Slowtzoff, Russisches Arch. der Pathologie 1898 (russ.).
[13]) Iliin, Über die organisierten Eiweißstoffe der Muskel. Diss. 1900 (russ.).

XXIII.

Über Diastase.

Erste Mitteilung.

Versuche zur Herstellung von Reindiastase und deren Eigenschaften.

Von **Sigmund Fränkel** und **Max Hamburg**.

Aus dem Laboratorium der L. Spiegler-Stiftung (Leiter: S. Fränkel).

Die Ansicht, daß das Leben der Bakterien nichts anderes sei, als die Summe verschiedenster Enzymwirkungen, verdanken wir Duclaux.

Die einzelnen Lebenserscheinungen der Bakterien, wie die verschiedenartigen Gärungen, die verschiedenartigen Spaltungen von Eiweiß, Polysacchariden und Fetten, ferner die Aufspaltung von Kohlehydraten in Alkohol und Kohlensäure, bzw. in fette Säuren lassen sich unabhängig von der lebenden Zelle durch Auszüge aus den Bakterienleibern in vitro nachahmen, so daß die vitale Tätigkeit der Zelle, unabhängig von der Zelle selbst, sich in eine Reihe von enzymatischen Vorgängen zerlegen läßt. Wenn man nun bedenkt, daß die Wirkungen der Enzyme reversible Reaktionen vorstellen, so daß ein Enzym, welches etwa Fett in Fettsäure und Glyzerin spaltet, andererseits wieder die Synthese von Fett- und Fettsäure und Glyzerin unter Wasserabspaltung bewirken kann, wenn man weiter bedenkt, daß die Maltase z. B. aus Maltose Dextrose erzeugt und wieder die Synthese der Maltose aus der Dextrose bewirken kann, so liegt es nahe, auch die synthetischen Prozesse in der lebenden Zelle, also den Aufbau und die Assimilation auf enzymatische Prozesse zurückzuführen. So hat auch Franz Hofmeister das Leben der Leberzelle, welche eine ungemeine Fülle von chemischen Prozessen auszuführen vermag, wie z. B. die Synthese des Glykogens, die Spaltung des Glykogens in Zucker, die Verwandlung von Hämatin in Bilirubin, die Erzeugung von Gallen-

säuren, die Umlagerung von karbaminsaurem Ammon in Harnstoff, die Entgiftung verschiedener Substanzen, die Überführung in Ätherschwefelsäuren und gepaarte Glykuronsäuren, sowie die verschiedenartigen anderen spaltenden und oxydativen sowie auch die reduzierenden Prozesse, als die Summe der Wirkungen verschiedener in der Leberzelle enthaltener Enzyme angesehen.

Über die Natur der Enzyme gehen nun die Meinungen ungemein auseinander; während einzelne die Enzyme nur als ein besonders aktives Eiweiß ansehen, haben die meisten Chemiker sich bemüht, gerade diese Frage nach der Richtung hin zu lösen, die Enzyme eiweißfrei darzustellen. Und anscheinend hat schon mancher Forscher eiweißfreie Lösungen von Enzymen in der Hand gehabt. Doch waren diese Lösungen, wenn auch noch sehr kräftig in der Wirkung, keineswegs ihren Mengenverhältnissen nach danach angetan, eine weitere chemische Untersuchung dieser Lösungen durchführen zu lassen, da die in der Lösung enthaltene Trockensubstanz meist sehr gering war oder so aschenreich, daß von einer weiteren Trennung abgesehen werden mußte. Wir haben eine Reihe von Substanzen aus pflanzlichen und tierischen Organismen zum großen Teile kristallisiert, zum großen Teile mit anderen Garantien für ihre Reinheit dargestellt, aber nur für die Enzyme sind solche Darstellungsverfahren bis jetzt nicht gelungen. Wir begnügen uns eigentlich, da wir kein chemisches Charakteristikon für Enzyme haben, sondern sie nur an ihrer spezifischen Energieentfaltung erkennen, damit, anzunehmen, daß die Lösungen, welche wir in der Hand haben, das betreffende Enzym enthalten. Da wir keine chemischen Anhaltspunkte für die Natur dieser Enzyme haben, leiden wir um so mehr unter Aufstellung von unbewiesenen Hypothesen. Einzelne Forscher, wie z. B. Arthus, halten die Enzyme überhaupt nicht für etwas Materielles, sondern für immaterielle Energiezentren. Oskar Löw denkt an aktives Pepton. Ja in letzter Zeit hat Nencki die Vorstellung erweckt, als ob die Enzyme in einem Riesenmoleküle enthalten wären, welches nukleoproteïdartiger Natur sei. Das Pepsin z. B. enthalte außerdem noch Chlor und Lecithin. Dieses Riesenmolekül zeige nicht nur eine enzymatische Funktion, sondern gleich mehrere, wenn es nicht durch irgend welche chemische Eingriffe geschädigt worden ist. Das Pepsin z. B. sei zugleich Labenzym, eine Anschauung, die Pawloff noch weiter verteidigt. Fehlen uns aber auch irgendwelche Anhaltspunkte über die Konstitution der Enzyme, wenn wir von der Ansicht absehen, daß sie eine besondere aktive Form des Eiweißes sind, so haben wir doch Vor-

stellungen über die stereochemische Konfiguration dieser Substanzen. Emil Fischer hat ja gezeigt, daß die Kohlehydrate und Glykoside spaltenden Enzyme nur auf bestimmte, immer in ihrer stereochemischen Konfiguration identische Biosen oder Glykoside einzuwirken vermögen und leitet daraus die Anschauung ab, daß die einzelnen Enzyme nur diejenigen Zuckerarten oder Glykoside anzugreifen vermögen, die eine ihrer eigenen ähnliche molekulare Konfiguration besitzen, eine Anschauung, die sich nicht nur auf die einfache Hydrolyse, sondern auch auf die Gärungen im allgemeinen übertragen läßt, sowohl auf solche, die lebendes Protoplasma bewirkt, als auch auf Gärungen, die das abgeschiedene Enzym verursacht.

Die Methoden, welche bis nun verwendet wurden, um Enzyme darzustellen, beruhen zum Teil auf der Eigenschaft unreiner Enzyme, durch Sättigung ihrer Lösung mit Neutralsalzen abgeschieden zu werden, eventuell erst beim schwachen Ansäuern dieser Lösung, oder in der Erzeugung eines Niederschlages in der Enzymlösung, welcher das Enzym mitreißt und Entfernung der Salze aus dem wiedergelösten Niederschlage durch Dialyse. Die allermeisten Methoden aber beruhen, und dieses ist insbesondere bei der Diastase der Fall, auf Fällung der Enzymlösungen durch Alkohol.

Man erhält auf diese Weise Präparate, deren Wirksamkeit in vielen Fällen kaum in Beziehung zu bringen ist mit der Wirksamkeit der Ausgangslösung. Bei unseren Untersuchungen haben wir vorerst konstatieren können, daß die vielfach geübte Methode der Dialyse ebenso wie jede Behandlung von Enzymlösungen mit viel destilliertem Wasser das Wirkungsvermögen ungemein schädigt und das um so mehr, je reiner die Lösung an und für sich ist. Es scheint, als ob die Enzymlösung selbst eine hydrolytische Spaltung durchmachen würde, und es kommt vor, daß eine sehr wirksame Enzymlösung nach etwa 12 Stunden unter solchen Umständen ihr Wirkungsvermögen entweder gänzlich verloren oder doch zum größten Teil eingebüßt hat, ohne daß man an eine bakterielle Wirkung denken könnte, oder auch ohne daß die Lösung sich irgendwie getrübt oder sonstwie sichtlich zersetzt hätte. Außerdem sind nach unseren Beobachtungen bestimmte Enzymarten dialysierfähig, worauf wir noch im Verlaufe unserer Abhandlung zurückkommen. Ferner konnten wir Beobachtungen machen, die geradezu alle Methoden, welche auf Alkoholbehandlung von Enzymen beruhen, fürderhin ausschließen. Alkohol schädigt insbesondere Diastase ungemein, wenn man Konzentrationen wählt, bei denen

in den Lösungen der Diastase Niederschläge entstehen und zwar um so mehr, je reiner die für den Versuch angewendete Lösung ursprünglich war. Es zeigt sich also, daß sowohl die Salzfreiheit der Lösung, als auch der Mangel fremder Substanzen, als auch der Einfluß von Alkohol und, wie wir später zeigen werden, anderer organischer Solventien, wie Aceton und Äther, um so stärker ist, je reiner die ursprüngliche Lösung. Das Niederreißen von Enzymen durch Erzeugung von Niederschlägen und Dialyse des gelösten Niederschlages darf von vornherein verworfen werden wegen der äußerst geringen Ausbeute an Enzym. Überdies war an ein solches Verfahren schon deshalb nicht zu denken, weil man Gefahr lief, durch die Autolyse des Enzyms, wie man diesen Vorgang bezeichnen kann, und durch Dialyse das Enzym einzubüßen. Auch das Niederreißen von Enzymen mit Metallsalzen hat sich, wie aus allen Untersuchungen der Enzymforscher hervorgeht, eigentlich nie bewährt. Erstlich, weil die Metallsalze aus den Lösungen eine Reihe anderer Substanzen mitreißen, die schwer entfernbar sind, zweitens, weil sie selbst die Enzyme und zwar meist oxydativ schädigen. Das Haften der unreinen Enzyme an den Schwefelmetallverbindungen, die wir bei der Aufspaltung des Enzymmetallniederschlages erhalten, vermindert ebenfalls die Ausbeute.

Wenn man nun nach diesen Erfahrungen zu Reindarstellungen von Enzymen überhaupt schreiten wollte, so ergaben sich nur wenige Fingerzeige, wie man vorzugehen hat. Aber wir hatten Anhaltspunkte, welche Wege wir überhaupt zu meiden haben, um nicht von vornherein die Enzyme durch die Reinigungsverfahren wesentlich zu schädigen. Das Verfahren, welches wir eingeschlagen haben, möchten wir das biologische nennen, wenngleich auch dieses Verfahren eine Kombination eines chemischen und eines biologischen Prozesses vorstellt. Wir verwenden aber die Chemikalien nicht etwa zur Fällung des Enzyms, sondern umgekehrt zur Trennung der Enzymlösung von einer Reihe anderer chemischer Substanzen, ohne irgendwie die Art und die Menge des Enzyms chemisch zu beeinflussen. Effront war der einzige, welcher vor uns etwas Ähnliches unternommen hat, aber auf einem Wege, der von dem unseren wesentlich verschieden, im Grundprinzip zwar analog, so doch im Effekt sehr different war. Er empfahl Malzauszüge mit dem gleichen Gewichte von Bierhefe, als das verwendete Malz hatte, zu vergären, nachdem man vorher die Hefe in Zuckerlösung gehalten, damit sie stickstoffhungrig wird. Hierauf wird die Flüssigkeit von der Hefe filtriert und mit Alkohol ausgefällt.

Das Verfahren, über welches wir berichten wollen, beruht zum Teil auf der schon von mehreren Forschern gemachten und trotzdem in der Literatur so häufig geleugneten Beobachtung, daß Enzyme durch Tonfilter durchzugehen vermögen. Wir haben uns überzeugt, daß dies besonders dann der Fall ist, und daß die Enzymlösungen fast quantitativ durchtreten, wenn sie nicht an und für sich sehr reich sind an Kolloiden, welche die Tonzellen nicht zu passieren vermögen, und wenn daher die Enzyme nicht durch mechanische Adsorption an den Kolloiden hängen bleiben.

Das Verfahren besteht aus drei Teilen, aus einem vorbereitenden Verfahren, bei welchem die nicht enzymatischen Substanzen zum großen Teile durch eine chemische Reinigung entfernt wurden, welche so geleitet wird, daß absolut kein Verlust an Enzym weder in quantitativer noch in qualitativer Hinsicht eintritt, aus einer mechanischen Reinigung und Sterilisierung durch ein Filtrationsverfahren und schließlich aus der biologischen Hauptreinigung, welche im wesentlichen auf einer in besonderer Weise geleiteten Reingärung beruht.

Es werden 5 kg Malzschrot von sehr diastasereichem Malz mit 15 Liter Wasser von 25° C eingemaischt. Nach einstündigem Umrühren überläßt man die Maische einer halbstündigen Ruhe, worauf man koliert und den Rückstand auspreßt. Die Kolatur wird zum Absetzen des mitgegangenen Malzmehles in der Kälte sedimentieren gelassen und hierauf vorsichtig abgepreßt.

Nun wird folgendes Verfahren eingeschlagen: Man bestimmt in abgemessenen Mengen des wässerigen Auszuges die diastatische Kraft in bezug auf Verflüssigung und Verzuckerung und setzt in anderen Proben derselben Menge des wässerigen Auszuges gemessene Quantitäten einer Lösung von basisch essigsaurem Blei so lange zu, als die diastatische Kraft keine merkliche Veränderung erfährt. Jetzt mißt man die Hauptmenge ab und setzt ihr die berechnete Menge derselben Bleiessiglösung zu. Bei diesem Verfahren überzeugt man sich, daß im Filtrate nach der Bleifällung Schwefelammon keine Bleireaktion zeigt. Man läßt absitzen, filtriert durch Papier, zieht die gesamte Lösung durch große sterile Pukalfilter rasch in sterile Flaschen und läßt nach Impfen mit einer geringen Menge einer Reinkultur von Frohberghefe, die man vorerst an zuckerarme, diastasereiche Nährböden gewöhnt hat, bei 28° C im Thermostaten vergären. Sobald die Gärung zu Ende, zieht man wieder durch Pukalfilter in einen vorher sterilisierten Vakuumapparat ein, destilliert die Lösung bei einem Druck von 10 mm Hg und engt etwa auf 500 ccm ein. Ist die Lösung sauer geworden, so ist es notwendig, mit etwas kohlensaurem Kalk zu neutralisieren. Es ist dabei notwendig, auch den kohlensauren Kalk, der dabei eingetragen wird, zu sterilisieren. Nun wird die Lösung mit sehr wenig einer Mischkultur von Frohberg- und Logoshefe, die in oben erwähnter Weise vorbehandelt ist, geimpft und einer neuerlichen Gärung unterzogen. Bei der zweiten Gärung empfiehlt es sich sehr, die Hefen vorerst stickstoffhungrig zu machen. Nun sucht man

möglichst den Endvergärungsgrad zu erreichen, engt wieder die Lösung nach dem Filtrieren durch Pukalfilter im Vakuum ein und erhält unter günstigen Arbeitsumständen eine sirupöse Flüssigkeit, die durch Einengen im absoluten Vakuum über Schwefelsäure in ein Pulver verwandelt werden kann. Auf diese Weise erhält man eine Substanz, die frei ist von gärbarem und reduzierendem Kohlehydrat und keine Eiweißreaktion mehr zeigt, selbst wenn man größere Mengen für die Reaktion verwendet.

Während dieses Prozesses haben wir einige Beobachtungen gemacht, die noch erwähnenswert sind. Die Lösungen dunkeln anscheinend unter Einwirkung einer Oxydase sehr stark nach. Dabei läßt sich beobachten, daß die dunkeln Lösungen den Farbstoff beim Durchziehen durch Pukalfilter fast gänzlich verlieren. An der Oberfläche der Pukalfilter setzt sich der braune Farbstoff ab.

Wir haben nun zur Abscheidung der reinen Diastase aus den eiweiß- und kohlehydratfreien Lösungen derselben eine Reihe von Versuchen angestellt, welche ein sehr interessantes Licht auf die Eigenschaften der Diastase werfen, ohne daß es gelingen würde, auf einem der zu besprechenden Wege tatsächlich die Diastase aus den Lösungen abzuscheiden. Und zwar sind es Methoden, die sonst bei unreiner Diastase nicht versagen, indem sie jedenfalls noch ein wirksames Präparat liefern, wenn auch die quantitative Ausbeute nicht immer eine gute zu nennen ist. So versuchten wir durch Erzeugung von Niederschlägen in der reinen diastatischen Lösung die Diastase abzuscheiden, wie es Cohnheim bei der Darstellung des Ptyalins, der Speicheldiastase, getan hat. Aber sowohl die Erzeugung von Niederschlägen von Calciumphosphat, wie auch von Baryumsulfat hatte nur den Effekt, daß nur ein sehr kleiner Teil der Diastase mitgerissen wurde, denn die diastatische Kraft des Filtrates hatte nur geringe Einbuße erlitten. Ebenso haben sich die Versuche, die Diastase mit voluminösen anorganischen Substanzen, wie Tonerdehydrat usw., zu schütteln und die Diastase auf diese Weise an ein anorganisches Substrat zu adsorbieren oder zu binden, nicht bewährt.

Unter den vielen untersuchten Substanzen hat nur eine die Eigenschaft gezeigt, die Diastase abzuscheiden, aber es ist zweifelhaft, ob nicht zugleich eine völlige Zerstörung der Diastase erfolgte. Wir versetzten die reine diastatische Lösung mit kolloidalem Eisenoxydhydrat; das sich sofort ausscheidende Eisenoxydhydrat riß anscheinend die Diastase sofort nieder, denn die diastatische Kraft der Lösung war fast Null, aber es ist uns auf keine Weise gelungen, aus dem Eisenniederschlag die Diastase wieder zu befreien, und der Eisenniederschlag selbst, in Seignettesalz gelöst, zeigte keinerlei diastatische Wirkung.

Unsere Versuche, die reine Diastase an ein anorganisches Kolloid zu binden, sowohl an ein saures als auch an ein basisches, hatten ebenfalls ein negatives Ergebnis. Weder die Verwendung von Kieselsäurehydrat, noch auch von Tonerde und Eisenoxydhydrat als Hydrosol führte zu dem gewünschten Ziele. Dies spricht sehr gegen die Anschauung von der kolloidalen Natur der Enzyme, wie auch eine Reihe anderer Umstände, auf die wir noch zu sprechen kommen werden.

Verschieden geladene Kolloide haben sonst die Eigenschaft, einander beim Zusammenbringen aus den Lösungen niederzureißen. Unsere Versuche, verschieden elektrisch geladene Kolloide auf diastatische Lösungen einwirken zu lassen und die Diastase auf diese Weise aus der Lösung zu präzipitieren, hatten keinerlei Erfolg zu verzeichnen. Wir haben nun Versuche unternommen, auf elektrischem Wege die diastatischen Lösungen zu reinigen bzw. anzureichern, Versuche, deren Mißlingen sehr lehrreich ist und ebenfalls gegen unsere ursprüngliche Anschauung spricht, daß dieses Enzym einen kolloidalen Charakter zeigt. Bei der Elektrolyse ihrer Lösungen zeigen die Kolloide die Eigenschaft, gegen die Anode zu wandern, aber die diastatischen Lösungen zeigten bei einer solchen Behandlung keinerlei Ausscheidung an der Anode und auch keinerlei Wandern zur Anode, ebenso wenig aber ein Wandern zu der Kathode oder eine Ausscheidung an der Kathode.

Wir machten hierbei auch die Beobachtung, daß der elektrische Strom, dessen Durchgang freilich durch die reinen diastatischen Lösungen einen sehr hohen Widerstand findet, die Diastase durch poröse Diaphragmen weder nach der einen, noch nach der anderen Richtung elektrosmotisch zu wandern befähigt, auch wenn man sehr hohe Spannungen des Stromes verwendet. Die porösen Diaphragmen setzen, wie wir durch unsere Darstellungsmethode gezeigt haben, dem Passieren der Diastase beim Durchsaugen der Lösungen keinerlei Widerstand entgegen, aber selbst als wir 110voltige Ströme zwischen Platinelektroden durch solche Diastaselösungen durchschickten, konnten wir keinerlei Ausscheidungen (Koagulation) bemerken, noch irgend ein Wandern zu einer der Elektroden beobachten, während dieses ein Charakteristikum der sogenannten gelösten Kolloide, sowie der feinen Suspensionen ist. Bredig nimmt an, daß die Enzyme kolloidalen Zustand haben, aber für die reinen Enzymlösungen stimmt eigentlich keines der charakteristischen Momente, bis auf die schwere Diffusion.

Unsere Lösung enthielt noch erhebliche Mengen dunkelbraunen Farbstoffs und es zeigte sich, daß weitaus die größte Menge desselben an der Anode zur Abscheidung gelangte.

Trotzdem läßt sich zeigen, daß die Diastase den Charakter eines Kolloids hat, und zwar gelingt dies mit Hilfe des Ultramikroskopes. Betrachtet man die nach unserem Verfahren dargestellte Lösung von Diastase mit Hilfe des Ultramikroskopes, so sieht man ausschließlich das bikonkave Lichtbüschel, was beweist, daß in der Lösung nur ganz kleine, selbst mit Hilfe des Ultramikroskopes nicht mehr auflösbare Systeme vorhanden sind, die das Licht reflektieren. Durch diese Beobachtung im Ultramikroskop läßt sich, wie wir glauben, erklären, wie die Diastase, die also nicht in wirklicher Lösung in der Flüssigkeit vorhanden ist, trotzdem poröse Tonfilter zu passieren vermag, weil eben die Moleküle so klein sind, daß sie fast quantitativ die minimalen Tonporen zu passieren vermögen. Die Diastase ist also anscheinend in ihren Lösungen in einem Zustande der Quellung, aber das Mikrosystem ist so klein, daß es durch das Ultramikroskop nicht mehr aufgelöst werden kann und so klein, daß es poröse Tonfilter zu passieren vermag.

Es ist von vornherein klar, daß das von uns angewendete Verfahren nur das ganze Ensemble der Diastasen zu liefern vermag. Es ist fast sicher und es läßt sich an einer Reihe von Beispielen zeigen, daß die Diastase kein einheitliches Enzym ist, sondern eine Gruppe von Enzymen, wie es ja auch von anderer Seite schon mehrfach betont wurde. Diese Enzymgruppe vermag die Stärke bis zum Traubenzucker abzubauen. Innerhalb dieser Gruppe läßt sich am besten die Einteilung treffen, daß man die Gruppe der Stärke verflüssigenden Diastasen von der Gruppe der Stärke verzuckernden Diastasen unterscheidet. Im Verfolge unserer Untersuchungen konnten wir nun bemerken, daß, wenn unsere Diastaselösung gegen gekochtes Brunnenwasser dialysierte, eine ziemlich deutliche Trennung der beiden Hauptgruppen der Diastasen erzielt werden konnte. Es zeigte sich, daß in das Wasser vornehmlich die verzuckernden Diastasen hineingehen, die verflüssigenden Diastasen innerhalb der Dialysiermembran bleiben. Während die verzuckernde Kraft des Membraninhaltes eine in die Augen springende Abnahme erfuhr, zeigte sich die verflüssigende Kraft desselben völlig unverändert. Man kann daraus schließen, daß diese beiden Diastasen eine verschiedene Größe des Moleküles besitzen, so daß die Annahme, daß die Diastase einheitlicher Natur sei und ihre differente Wirkung

auf die verschiedenen Einwirkungstemperaturen zurückzuführen sei, hinfällig wird. Wir sind beschäftigt, diese Beobachtung zu vervollständigen, und vielleicht gelingt es uns, auf diese Weise durch fraktionierte Dialyse eine Trennung der beiden, von uns supponierten Diastasegruppen herbeizuführen.

Über die Eigenschaften des von uns dargestellten trockenen Diastasepräparates möchten wir vorläufig einiges bemerken:

Das Diastasepräparat ist im Gegensatze zu den gewöhnlichen unreinen Diastasepräparaten chemischen Einflüssen gegenüber ungemein empfindlich. Löst man das Präparat in wenig Wasser und versetzt es mit Alkohol, so geht nach kurzer Zeit die Diastase zugrunde, wenn man nicht sehr rasch die Fällung der weiteren Einwirkung des Alkohols entzieht. In gleicher Weise wirkt Aceton, während wir ja wissen, daß lebende Hefe von Aceton nicht geschädigt wird und auf diesem Wege, wie Eduard Buchner gezeigt hat, sogar trockene Dauerhefe dargestellt werden kann. Es wird aus diesen Versuchen ersichtlich, daß, wenn die Diastase von ihren Substraten und von ihren Begleitstoffen, an denen sie haftet, abgetrennt wird, ihre Resistenz gegenüber den Einflüssen von Alkohol, Aceton, Äther und, wie wir in vielen Fällen gesehen haben, auch gegen destilliertes Wasser ungemein absinkt. Das von uns dargestellte Präparat war auch gegen hochgespannte Ströme sehr wenig resistent.

Das Präparat stellte ein lichtgelbes, in Wasser leicht lösliches, in Alkohol unlösliches Pulver vor, welches die Biuretreaktion sowie die Xanthoproteïnlösung nicht mehr gab, mit alkalischer Bleilösung gekocht, keine Schwarzfärbung zeigte. Hingegen zeigte es spurenweise Millonsche Reaktion. (Ein stärkeres Auftreten der Millonschen Reaktion beobachteten wir einmal, was wir dem Vorhandensein einer kleinen Menge von Tyrosin im Präparate zuschreiben.) Die Lösung reduzierte Fehlingsches Reagens nicht, zeigte aber einen positiven Ausfall der Molischschen Reaktion, ferner schwache Pentosenreaktion. Die Seliwanoffsche Reaktion auf Lävulose fiel negativ aus. Die wässerige Lösung ließ sich zum kleinen Teil sowohl durch Kochsalz, Ammonsulfat und Magnesiasulfat aussalzen. Die Niederschläge zeigten starke diastatische Eigenschaften, aber auch die salzgesättigte Lösung. Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure bewirkten in der wässerigen Lösung schwache Trübung, ebenso essigsaures Blei und basisch essigsaures Blei.

Wir beschäftigen uns gegenwärtig mit der Darstellung größerer Mengen dieser ungemein aktiven Substanz, welche sich so bei

sorgfältiger Arbeitsweise mit sehr geringen Verlusten an diastatischer Kraft — auf das Ausgangsmaterial bezogen — gewinnen läßt, und werden in nächster Zeit über die Methodik und die Ergebnisse weitergehender Reinigungsversuche und der Spaltungsprodukte dieser Substanz berichten.

Die Übertragung dieses Verfahrens auf die Reinigung anderer Enzyme ist im hiesigen Institute gegenwärtig im Gange.

Anmerkung: Schließlich danken wir der Firma Hauser & Sobotka, Erste Wiener Export-Malzfabrik, Stadlau, für die freundliche Überlassung des notwendigen Ausgangsmateriales.

XXIV.

Über eine neue Gruppe von stickstoffhaltigen Kohlehydraten.

Von **Th. R. Offer** (Wien).

Aus dem Laboratorium der L. Spiegler-Stiftung (Leiter: S. Fränkel).

Die stickstoffhaltigen Zuckerarten (Kohlehydrate) sind in den tierischen Geweben zahlreich vertreten. Die bekanntesten sind das Chitin sowie sein Spaltungsprodukt, das von Ledderhose entdeckte Glykosamin, welches im Chitin in acetylierter Form enthalten ist, da es Fränkel und Kelly [1]) gelungen ist, aus dem Chitin Acetylglykosamin durch Hydrolyse mit Säure in der Kälte darzustellen, ferner das im Eiweiß enthaltene Albamin (Fränkel [2]), $2(C_6H_9O_4.NH_2) + H_2O$, welches als Diglykosamin aufzufassen ist, da es bei der Hydrolyse Glykosamin gibt; sodann die Chondroitinschwefelsäure, $C_{18}H_{27}NSO_{17}$, die Schmiedeberg [3]) als acetyliertes Derivat des Glykosamins und der Glykuronsäure ansieht, was aber von Orgler und Neuberg [4]) geleugnet wird. Alle diese sind Derivate von Kohlehydraten mit 6 Kohlenstoffen (Hexosen). Hingegen konnte bisher ein analoges Derivat der Pentosen nirgends nachgewiesen werden, obzwar das Vorkommen stickstofffreier Pentosen im Organismus bekannt ist, die zum Teil frei, zum Teil in Nukleïnsäuren gebunden vorkommen.

So fand Kossel [5]) in der Hefenukleïnsäure eine Substanz, die bei der Destillation mit Salzsäure Furfurol gab. Hammarsten [6]) fand im Pankreas ein Nukleoproteïd, das Furfurol abspaltete, und

---

[1]) Monatsh. f. Chem. **23**, 123 (1902).
[2]) Ebenda **19**, 717 (1898).
[3]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **28**, 355 (1891).
[4]) Zeitschr. f. phys. Chem. **37**, 407.
[5]) Arch. f. Phys., S. 159 und 380 (1893).
[6]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 28 (1894).

Salkowski[1]) konnte zeigen, daß die Furfurol liefernde Gruppe im Pankreasnukleoproteïd eine Pentose ist.

Gelegentlich der Konstitutionsaufklärung der Pankreasproteïdpentose, welche Neuberg[2]) als l-Xylose gekennzeichnet hat, schließt dieser die Möglichkeit eines Vorliegens von Aminoxylose, etwa eines niederen Homologen des Glykosamins, aus, so daß nach seiner Überzeugung die Organpentose im Gegensatze zum typischen Eiweißzucker keine Aminogruppe enthält.

Um so größeres Interesse verdienen die durch den weiter unten beschriebenen Vorgang von uns ohne Einwirkung von Hydrolyse aus Pferdeleber isolierten Aminopentosen.

Meine Versuchsanordnung war folgende:

Versuch A.

10 kg frische Pferdeleber wurden mittels einer Fleischmaschine zu einem Brei zerkleinert, mit 5 l reinem Aceton übergossen, 2 bis 3 Wochen stehen gelassen; das acetonige Extrakt wurde abgegossen, der Brei ausgepreßt, die beiden Flüssigkeiten vereinigt. Dieses Extraktionsverfahren wurde mehrmals wiederholt, und die vereinigten acetonigen Extrakte wurden im Vakuum eingeengt. Der zurückbleibende Sirup enthielt eine Reihe von Substanzen, deren Gegenwart in der Leber schon bekannt ist. Nachgewiesen wurden: Cystin (durch Bleireaktion, Löslichkeit in NH_3 und Ausfallen desselben auf Zusatz von Essigsäure, sowie durch die typische Kristallform), ferner Milchsäure (mittels Eisenchlorid im Ätherextrakte). Weiter enthielt der Sirup eine geringe Menge von reduzierenden Kohlehydraten, von Cholesterin und Fett. Thiomilchsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Der mit Aceton wiederholt extrahierte Leberbrei wurde dann mit 5 l Alkohol (95 Proz.) übergossen und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Alkohol wurde öfters erneuert, das vereinigte alkoholische Extrakt im Vakuum eingeengt und der restierende Sirup mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt.

Es entstand ein Niederschlag von jecorinähnlichen Eigenschaften; aber in der gefällten Substanz selbst konnte auf keine Weise eine Kohlehydratgruppe nachgewiesen werden. Über das Wesen dieser Substanz und über ihre Stellung zum Jecorin sind noch Untersuchungen im Zuge, über welche wir demnächst berichten werden.

Das alkoholisch-acetonige Filtrat von diesem Niederschlag wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther ausgeschüttelt. Die wässerige Schicht wurde im Vakuum abermals bis zum Sirup eingeengt. Dieser Sirup wurde auf Kohlehydrate untersucht. Er zeigte die Pentosenreaktionen mit Phloroglucin und Salzsäure, sowie mit Orcin, Salzsäure und Eisenchlorid. Der Sirup wurde nun mit Wasser versetzt und mit verdünnter Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure so lange gefällt, als noch ein gefärbter Niederschlag entstand, hierauf wurde rasch

[1]) Berl. klin. Wochenschr., 1895, S. 17. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 535.
[2]) Ergebn. d. Phys. 3, Biochemie, 399 (1904).

filtriert. Das Filtrat wurde mit Barythydrat genau neutralisiert. Nachdem vom schwefelsauren Baryum abfiltriert war, wurde noch Kohlensäure eingeleitet, von dem kohlensauren Baryt getrennt und das Filtrat wurde wiederum im Vakuum eingeengt. Der restierende Sirup wurde nun mit Methylalkohol verrieben und so lange neuer Methylalkohol zugesetzt, als noch Fällung auftrat. Diese Fällung wurde auf einem Filter gesammelt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zur Reinigung der Substanz wurde dieselbe im Wasser gelöst und mit Methylalkohol umgefällt.

Wegen der geringen Ausbeute konnte keine analysenreine Substanz gewonnen werden, doch erwies sich die Substanz als eine Baryumverbindung eines N-haltigen Kohlehydrates, welches die Pentosenreaktion gab, keine Reduktion zeigte, aber nach dem Kochen mit Salzsäure Fehlingsche Lösung reduzierte. Auf Grund dieser Reaktionen durfte ich die Ansicht aussprechen, daß in der Leber normalerweise eine Polyaminopentose enthalten ist[1].

Versuch B.

Da es sich gezeigt hat, daß heißes Wasser und nicht allzu langes Kochen auf die Substanz keinen Einfluß haben, haben wir zur Darstellung größerer Mengen dieser Substanz folgenden Weg eingeschlagen und hierbei zwei differente Substanzen, die Aminopentosen zur Grundlage haben, gewonnen:

15 kg Pferdeleber wurden zu Brei zerkleinert, dieser sofort in siedendes Wasser geworfen und durch 5 Minuten ausgekocht. Das Wasser wurde dreimal erneuert. Im ganzen gelangten 30 l Wasser zur Verwendung. Die einzelnen Dekokte wurden filtriert, der Brei wurde ausgepreßt und die vereinigten Filtrate im Vakuum auf ein Drittel ihres ursprünglichen Volumens eingeengt, hierauf wurde mittels Zinkacetat in der Siedehitze enteiweißt und die Flüssigkeit nach dem Auskühlen mit fast dem doppelten Volumen absoluten Alkohols versetzt, bis eine entnommene Probe keine Fällung mit Alkohol mehr gab. Das Filtrat, welches nun eiweiß- und glykogenfrei war, wurde mit Schwefelwasserstoff vom Zink befreit und im Vakuum auf einen halben Liter eingeengt. Diese Flüssigkeit wurde mit der doppelten Menge Methylalkohol versetzt, wobei ein Niederschlag entstand. Das Filtrat von diesem Niederschlag wurde wiederum im Vakuum eingeengt und dann mit der gleichen Menge absoluten Methylalkohols versetzt und in den Eiskasten gestellt.

1. Niederschlag.

Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure versetzt und mit Phosphorwolframsäure, wie im Versuch A, gefällt. Das Filtrat wurde mit Baryumkarbonat neutralisiert, filtriert, im Vakuum eingeengt und abermals mit Methylalkohol gefällt. Die Ausbeute war sehr gering, so daß, um

[1]) Vortrag auf der Naturforscherversammlung Meran 1905 (Sektion Physiologie).

eine analysenreine Substanz zu erhalten, ich den Versuch machte, die Baryumverbindung in eine Kupferverbindung umzusetzen. Zu diesem Zwecke wurde die mit Methylalkohol gefällte Substanz in Wasser gelöst und mit chemisch reinem Kupferchlorid versetzt. Es entstand ein flockiger Niederschlag, welcher, auf dem Platinspatel geprüft, sich als anorganisch erwies. Das Filtrat von diesem Niederschlag wurde nun mit Methylalkohol versetzt, es entstand hierbei eine amorphe Fällung, während das überschüssige Kupferchlorid im Methylalkohol in Lösung blieb. Der Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt, mehrmals mit Methylalkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Nach dem Trocknen ist die Substanz in Wasser unlöslich, ferner ist sie unlöslich in Alkohol, in Weingeist, Methylalkohol und in Äther; löslich in verdünnter Säure und im säurehaltigen Alkohol und Methylalkohol.

Mit Fehlingscher Lösung gibt sie keine Reduktion. Nach dem Kochen mit starker Salzsäure wird Fehlingsche Lösung reduziert. Mit Phloroglucin und Salzsäure, sowie mit Orcin und Salzsäure (ohne Zusatz von Eisenchlorid) gibt die Substanz prompt die charakteristische Pentosenreaktion.

Eine Probe, mit reinem Natronkalk erhitzt, entwickelt Ammoniak.

Die Substanz wurde im absoluten Vakuum bei 100° C über Schwefelsäure im Hans Meyerschen Apparat zur Konstanz getrocknet.

0,2430 g Substanz geben:

0,2007 g CO_2, entsprechend 0,05473 g C, entsprechend 25,61 Proz. C.
0,0659 g H_2O, „ 0,00732 g H, „ 3,43 Proz. H.

0,2329 g Substanz geben:

12,03 ccm N bei T = 18,2°, B = 752,5 mm, entsprechend 0,01374 g, entsprechend 5,89 Proz. N.

0,3283 g Substanz geben:

0,1104 g CuO, entsprechend 0,0881 g Cu, entsprechend 26,85 Proz. Cu.
0,0237 g fremde Asche, d. i. 7,53 Proz. fremde Asche.

Auf aschefreie Substanz berechnet:

C	27,69 Proz.
H	3,709 „
N	6,369 „
Cu	29,03 „
O	33,18 „

Diese Ergebnisse entsprechen der Formel: $C_{10}H_{16}N_2O_7(CuO)_2$. Die prozentuelle Zusammensetzung wäre berechnet:

C	27,65 Proz.
H	3,68 „
N	6,45 „
Cu	29,03 „
O	33,18 „

Diese Substanz, frei von Kupfer, läßt sich am ehesten als:

$$\underline{C_{10}H_{20}N_2O_7}$$

auffassen, unter der Annahme, daß vier Wasserstoffe durch Kupfer ersetzt sind. Unter dieser Voraussetzung läßt sich diese Bruttoformel weiterhin nach Analogie mit der Fränkelschen Albaminformel auflösen in

$$\underline{2\ (C_5H_7O_3 . NH_2) + H_2O.}$$

Es ist dann der gefundene Körper als Biose eines Pentosamins aufzufassen, also als Dipentosamin.

Die zugrundeliegende Monose muß dann analog dem Glykosamin der Formel $C_5H_9O_4 . NH_2$ entsprechen. Für diese Auffassung der Substanz als Dipentosamin sprechen folgende Befunde: Die Analogie in den Eigenschaften mit dem Diglykosamin, das Ergebnis der Elementaranalyse, der Mangel der Reduktion bei der nicht hydrolysierten Substanz, und ihr Auftreten nach der Hydrolyse; für den Pentosencharakter der zugrundeliegenden Monose sprechen zweifellos die positiven Ergebnisse der beiden typischen Reaktionen mit Phloroglucin und Orcin.

2. Alkoholische Lösung.

Nach mehrtägigem Stehen im Eiskasten schied sich aus der alkoholischen Lösung ein sirupöser Bodensatz ab, von welchem glatt abgegossen werden konnte. Dieser Bodensatz wurde in Wasser gelöst und, da er sauer reagierte, mit verdünnter Kalilauge bis zur neutralen Reaktion versetzt. Hierauf wurde eine konzentrierte Lösung von Kupferchlorid zugesetzt; es entstand ein Niederschlag — anorganisch —, von dem abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde mit Methylalkohol versetzt.

Die Elementaranalyse dieser Substanz werden wir, sobald wir sie analysenrein haben, mitteilen. Die vom Bodensatz abgegossene Lösung wurde im Vakuum eingeengt, der wässerige Rückstand mit Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure so lange gefällt, als noch ein gefärbter Niederschlag entstand. Das Filtrat von diesem Niederschlage wurde mit Barythydrat versetzt und nach Abfiltrieren von dem ausgeschiedenen schwefelsauren Baryt abermals im Vakuum eingedampft und zwar bis zum Sirup. Der Sirup wurde mit absolutem Methylalkohol angerieben.

Die Fällung wurde auf dem Filter gesammelt und mit absolutem Methylalkohol und Äther gewaschen, im Vakuum getrocknet und wieder in wenig Wasser aufgelöst, wobei eine Trübung entstand, von der abfiltriert wurde. Das klare Filtrat wurde mit der vierfachen Menge absoluten Alkohols versetzt, die entstehende Fällung absitzen gelassen und der Alkohol abgegossen. Die alkoholische Lösung wurde jetzt wieder mit Methylalkohol gefällt, gesammelt und in der vorigen Weise getrocknet.

Die getrocknete Substanz ist etwas gelb gefärbt. Während bei Gegenwart von Methylalkohol dieselbe zuvor sehr hygroskopisch war, läßt sie sich nach dem Trocknen im Vakuum leicht zerreiben, wobei sie beim Reiben in der Achatschale elektrische Eigenschaften zeigt, ähnlich dem Albamin.

Die Substanz ist leicht löslich in Wasser; bei Zusatz größerer Mengen Wasser tritt nach einiger Zeit eine leichte Trübung auf. Sie ist löslich in Weingeist, unlöslich in Äther und in Methylalkohol. Fehlingsche Lösung wird von ihr direkt nicht reduziert, hingegen nach dem Kochen mit Salzsäure. Mit Phloroglucin und Salzsäure, sowie mit Orcin, Salzsäure und Eisenchlorid treten nach längerem intensivem Kochen die charakteristischen Pentosenreaktionen auf.

Für die Analyse wurde die Substanz im absoluten Vakuum bei 100° C über Schwefelsäure im Hans Meyerschen Apparat getrocknet.

0,2531 g Substanz geben:

0,2893 g CO_2, entsprechend 0,0789 g C, entsprechend 31,568 Proz. C.
0,0951 g H_2O, „ 0,0105 g H, „ 4,172 Proz. H.

0,2528 g Substanz geben:

11,8 ccm N bei T = 17,9° C, B = 747 mm, entsprechend 0,01339 g N, entsprechend 5,29 Proz. N.

0,1914 g Substanz geben:

0,0926 g $BaSO_4$, entsprechend 0,054 g Ba, entsprechend 28,42 Proz. Ba.

0,3939 g Substanz geben bei der Phosphorsäurebestimmung 0,0087 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 0,00554 g P_2O_5.

Dieser Menge P_2O_5 entsprechen $Ba_3(PO_4)_2$ 0,0241 g = 6,11 Proz. fremde Asche.

Auf aschefreie Substanz berechnet:

C	33,622	Proz.
H	4,446	„
N	5,634	„
Ba	26,432	„
O	29,866	„

Die Ergebnisse entsprechen der Formel: $C_{14}H_{22}N_2O_9Ba$.

Die prozentuelle Zusammensetzung wäre berechnet:

C	33,668	Proz.
H	4,409	„
N	5,611	„
Ba	27,454	„
O	28,856	„

Die dieser Barytverbindung zugrundeliegende Verbindung läßt sich am ehesten als eine Substanz auffassen mit der Bruttoformel

$C_{14}H_{24}N_2O_9$. Diese Bruttoformel ließe sich dann auflösen in ein diacetyliertes Dipentosamin $2(CH_3.CO).C_{10}H_{18}N_2O_7$ [1]). Wenn unsere Annahmen über die Konstitution der beiden gefundenen Substanzen sich durch die Ergebnisse der Hydrolyse stringenter beweisen lassen, so wären in der Leber zwei Substanzen vorhanden, von denen die eine ein Dipentosamin, die andere ein Diacetyldipentosamin vorstellen würde. Den genetischen Zusammenhang dieser beiden wird man wohl schwer feststellen können, da unser Organismus sowohl die Fähigkeit hat, Aminogruppen zu acetylieren, als auch umgekehrt am Stickstoff sitzende Acetylgruppen abzusprengen, wofür wir Beispiele sowohl in der Bildung der Merkaptursäuren, als auch in der Entstehung von p-Aminophenol aus Acetanilid haben.

Wir bleiben mit dem Studium der hydrolytischen Spaltungsprodukte der beiden gefundenen Substanzen beschäftigt und hoffen, in nächster Zeit einen weiteren Beitrag zur Kenntnis dieser Körper liefern zu können. Die großen Schwierigkeiten der Reindarstellung dieser Körper waren der Gewinnung größerer Substanzmengen sehr hinderlich.

---

[1]) Die Differenz im Prozentgehalt des Baryums zwischen dem gefundenen und berechneten Werte läßt sich wohl aus der Verunreinigung der Substanz mit Phosphorsäure erklären, da wir nicht wissen, ob tatsächlich $Ba_3(PO_4)_2$, wie berechnet, als Verunreinigung vorliegt.

Kürzere Mitteilungen.

5. Zur Konstitution des Histidins.

Von **A. Windaus** und **F. Knoop.**

Aus der medizinischen Abteilung des Universitätslaboratoriums zu Freiburg i. B.

Vor einiger Zeit[1]) haben wir gezeigt, daß Histidin beim Ersatz der Aminogruppe durch Wasserstoff in eine neue Säure übergeht, die mit der von uns bereiteten synthetischen Imidazolpropionsäure identisch ist. Damit ist die Natur des stickstoffhaltigen Ringsystems im Histidin aufgeklärt und die Frage nach der Konstitution dieses Eiweißspaltungsproduktes bis auf die Stellung der Aminogruppe erledigt. Diesen Feststellungen gegenüber hat S. Fränkel[2]), ohne sich mit den Tatsachen unserer Beweisführung auseinanderzusetzen, einige allgemeine und, wie wir sehen werden, nicht stichhaltige Einwände gegen das Vorhandensein eines Imidazolkernes erhoben.

1. Fränkel hat gefunden, daß das Ringsystem des Histidins von Benzoylchlorid und Natronlauge nicht aufgesprengt wird. Er hält diese Beständigkeit mit der Annahme eines Imidazolringes nicht für vereinbar; denn die Aufspaltung mit Benzoylchlorid und Natronlauge sei „die einzig bekannte, wirklich charakteristische Reaktion des Imidazolringes". Diese Behauptung trifft nun in keiner Weise zu. Niementowsky[3]), dem wir spezielle Untersuchungen über diese Reaktion verdanken, faßt seine Erfahrungen folgendermaßen zusammen: „Aus meinen Beobachtungen geht hervor, daß die von Bamberger und Berlé studierte Aufspaltung des Imidazolringes keine allgemeine Reaktion ist, sie beschränkt sich wahrscheinlich auf das Glyoxalin und einige einfache Derivate desselben, ist aber nicht durchführbar an den in β-Stellung phenylierten Benzimidazolen und auch an Bromderivaten der einfachen Benzimidazole." Wir können nach eigenen Untersuchungen hinzufügen, daß selbst so einfache Derivate, wie die $\alpha\beta$-Imidazoldicarbonsäure, die durch Kohlensäureabspaltung glatt in Imidazol übergeht, durch Benzoylchlorid und Natronlauge nicht aufgespalten wird. Auch O. Fischer[4]) hebt in Anlehnung an Niementowsky ausdrück-

[1]) Diese Beiträge 7, 144.
[2]) Ebenda 8, 156.
[3]) Ber. 32, 1460.
[4]) Ebenda 34, 932.

lich hervor, daß die Aufspaltung durch Benzoylchlorid und Natronlauge keineswegs allgemein anwendbar sei, sich vielmehr auf einige einfache Imidazole (wie Glyoxalin und Benzimidazol) beschränke, aber bei einigermaßen komplizierten Imidazolen, z. B. beim Naphtimidazol, versage. Aus den Ausführungen Niementowskys und O. Fischers, die Fränkel offenbar entgangen sind, sowie aus unseren Beobachtungen, die wir durch weitere Beispiele ergänzen könnten, geht also mit Sicherheit hervor, daß die Resistenz des Histidins gegen Benzoylchlorid und Natronlauge durchaus nichts gegen den Imidazolcharakter beweist.

2. Auch die in dem gleichen Zusammenhange geäußerte Vermutung Fränkels, daß sich die Imidazole gegen Benzoylchlorid und gegen Naphtalinsulfochlorid analog verhalten dürften, trifft nicht zu. Das Methylimidazol z. B., das durch Benzoylchlorid und Kalilauge so leicht angegriffen wird, kann durch Benzolsulfochlorid und Kalilauge nicht aufgespalten werden. Wir erwähnten dies bereits in unserer Arbeit über die Überführung von Traubenzucker in Methylimidazol [1]), und wir können jetzt hinzufügen, daß sich auch Naphtalinsulfochlorid und Kalilauge als wirkungslos erweisen. Diese Sulfochloride verhalten sich also den Imidazolen gegenüber ganz anders als Benzoylchlorid.

3. Auch die Löslichkeit des Histidinsilbersalzes in Ammoniak führt Fränkel gegen die Imidazolnatur ins Feld; er stützt sich hierbei auf Burian [2]), der zuerst auf die Unlöslichkeit vieler Imidazolsilbersalze in Ammoniak hingewiesen hat und dieser Reaktion eine allgemeinere Bedeutung zugesprochen hat. Trotzdem muß die Gültigkeit dieser Reaktion etwas eingeschränkt werden. In unserer Arbeit über Histidin haben wir gerade mit Rücksicht auf die Befunde von Burian ausdrücklich hervorgehoben, daß sich imidazolpropionsaures Silber leicht in Ammoniak auflöst [3]); und diese Löslichkeit der Silbersalze in Ammoniak haben wir seitdem noch an einigen anderen synthetischen Imidazolabkömmlingen beobachtet. Dadurch wird also auch dieser Einwand hinfällig.

4. Außer diesen theoretischen Erörterungen führt Fränkel auch experimentelles Material für seine Behauptung ins Feld.

Während wir nämlich im Histidin den Ersatz der Aminogruppe durch Wasserstoff in der Weise durchgeführt haben, daß wir das Oxydesaminohistidin mit Jodwasserstoff im Rohr reduzierten, hat Fränkel zunächst an Stelle der Aminogruppe Chlor eingeführt und letzteres durch andauerndes Kochen mit Zinkstaub durch Wasserstoff ersetzt. Sein Produkt, die „Histincarbonsäure", schmilzt um 13° niedriger als unser Derivat (195° gegenüber 208°). Aus Fränkels Darstellung geht nicht hervor, ob er Reinigungsversuche mit seiner Säure angestellt hat, um den Schmelzpunkt eventuell in die Höhe zu rücken, während wir unser Produkt zunächst über ein Phosphorwolframat gereinigt und dann wiederholt aus Wasser und Aceton umkristallisiert hatten. Die Schmelzpunktsdifferenz von 13°, um die sein Präparat niedriger schmilzt, genügt ihm, um die Identität der beiden Produkte zu bezweifeln.

[1]) Ber. 38, 1169.
[2]) Ebenda 37, 696.
[3]) Diese Beiträge 7, 147.

Irgend eines der von uns beschriebenen Derivate, das die Verschiedenheit beider Präparate am einfachsten hätte erweisen können, hat Fränkel nicht dargestellt.

Wir haben deshalb 0,264 g Chlorhistincarbonsäure, die uns Herr Fränkel freundlichst übersandt hat, nach seinen Angaben reduziert und den Zersetzungspunkt der erhaltenen Säure nach einmaligem Umkristallisieren bei 202°, bei weiterem Umkristallisieren bei 206° (korr. 209°) gefunden. Außerdem haben wir uns überzeugt, daß die „Histincarbonsäure" genau dasselbe höchst charakteristische Phosphorwolframat liefert wie die Imidazolpropionsäure, das aus heißem Wasser in regelmäßigen rechteckigen Täfelchen kristallisiert. Da es uns trotz so geringer Mengen Ausgangsmaterial gelungen ist, den Schmelzpunkt gegenüber der Fränkelschen Angabe um 11° heraufzurücken, so besteht für uns kein Zweifel, daß die „Histincarbonsäure" nichts anderes ist als ungenügend gereinigte Imidazolpropionsäure. Auf eine ausführliche Untersuchung haben wir indessen zunächst verzichtet, da Herr Fränkel, dem wir unsere Resultate mitgeteilt haben und dem wir synthetische Imidazolpropionsäure zur Verfügung stellen, sich selbst von der Identität der beiden Säuren überzeugen will.

5. Ob die weiteren Angaben Fränkels über ein angebliches Abbauprodukt des Histidins von der Formel $C_4H_6N_2O_2$ mit dem Vorhandensein eines Imidazolringes vereinbar sind oder nicht, vermögen wir vorläufig nicht zu beurteilen, weil Fränkels experimentelles Material über diese Versuche in der Form, wie es publiziert ist, eine kritische Verwertung vorderhand nicht zuläßt. So findet er z. B. bei der Barytspaltung einen Körper, der bei 115° 15,75 Proz. Kristallwasser abgibt, und berechnet nach seinen Analysenzahlen für die 1 Proz. Asche enthaltende, vakuumtrockene Substanz die Formel $C_4H_6N_2O_2 + 2 H_2O$. Der Wert für diese 2 Mol. Wasser, den Fränkel nicht berechnet, ist aber nicht 15,75 Proz., sondern 24,0 Proz. Die Formel Fränkels ist danach keineswegs begründet. — Auch einige andere Angaben von Fränkel erscheinen uns nicht einwandfrei, und vor allem vermissen wir irgendwelche präzise Daten über Darstellungsverfahren und physikalische Konstanten, die uns eine Nachprüfung ermöglichen könnten.

Freiburg i. B., Mai 1906.

Berichtigung.

In Heft 5/7, Seite 251, Zeile 23 von oben muß es heißen: Substanzen der **ersten** und **zweiten** Gruppe statt der zweiten und dritten Gruppe.

☞ Diesem Hefte liegen bei: Drei Prospekte der Verlagsbuchhandlung **Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig,** betr. 1. ***Baeyer's*** gesammelte Werke. — 2. ***Erdmann***, Anorganische Chemie. — 3. ***Nagel***, Handbuch der Physiologie des Menschen.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Straßburg

---

VIII. Band 11. und 12. Heft

(Ausgegeben August 1906)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1906

Inhalt des 11. und 12. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie“ erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von etwa 30 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge“ soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer tatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen“ kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.

XXV.

Der zeitliche Ablauf der Eiweißzersetzung bei verschiedener Nahrung.

Von Dr. **H. Vogt**, Assistenzarzt der Klinik.

Aus der Medizinischen Klinik zu Marburg (Direktor: Prof. Brauer).

Die erste große Aufgabe, die sich für die quantitative Erforschung der Stoffwechselvorgänge im tierischen Organismus darbot, war die Feststellung des Bedarfs an den verschiedenen Nahrungsbestandteilen unter wechselnden Bedingungen. Wenn auch in dieser Hinsicht noch wichtige Fragen der endgültigen Erledigung harren und noch wertvolle Resultate erzielt werden können — ich erinnere, um nur ein Beispiel aus letzter Zeit anzuführen, an die schönen Untersuchungen von Chittenden über den Eiweißbedarf des Organismus — so sind doch die grundlegenden Tatsachen dieses Teiles der Stoffwechsellehre als gesichert zu betrachten. In neuerer Zeit hat sich die Forschung mit fortschreitender Entwickelung der chemischen Methodik und der Kenntnis der chemischen Zusammensetzung der in Betracht kommenden Substanzen mit besonderer Vorliebe der Bearbeitung des sogenannten intermediären Stoffwechsels zugewandt. Nicht nur die Physiologen, sondern in gleicher Weise auch die Pharmakologen und Pathologen sind dahin gelangt, diesem Gebiete ihr Interesse zuzuwenden. Um nur einige Beispiele anzuführen, sei erinnert an die Fülle von Arbeit, die der Frage nach der Entstehung von Zucker aus Eiweiß im Organismus in den letzten Jahren zugewandt worden ist. So ist auch die Erforschung des Harnsäurestoffwechsels eine gleich dringliche Aufgabe der Physiologie wie der Klinik geworden. Eine Reihe der wertvollsten Ergebnisse verdanken wir dem namentlich von Pharmakologen angewandten Verfahren, die Schicksale in den Körper eingeführter Substanzen in qualitativer wie quantitativer Hinsicht zu verfolgen.

Als ganz besonders fruchtbringend erwies sich diese Methodik, als man dazu überging, den Einfluß der einzelnen Organe auf Abbau oder Synthese eingeführter Substanzen festzustellen. War doch damit auch die Möglichkeit gegeben, die Bedeutung krankhafter Funktionsstörung der Organe für den Ablauf des intermediären Stoffwechsels zu untersuchen. So ist die Feststellung der Tatsache, daß die Leber Aminosäuren in Harnstoff überzuführen vermag, nicht nur für die Lehre von der normalen Harnstoffbildung wichtig gewesen, sie lieferte uns auch den Beweis dafür, daß das bei der akuten gelben Leberatrophie beobachtete Auftreten von Aminosäuren im Harn als direkte Folge des Ausfalles der Leberfunktion zu betrachten ist.

Im Verhältnis zu der Fülle von Arbeit, die auf die Frage des qualitativen und quantitativen Ablaufes intermediärer Prozesse, sowie deren Lokalisation seither verwendet wurde, sind die Verhältnisse des zeitlichen Ablaufes dieser Vorgänge auffallend wenig beachtet worden. Doch liegt schon eine Reihe von Tatsachen vor, aus denen hervorgeht, daß in dieser Hinsicht wesentliche Verschiedenheiten zu beobachten sind. So ist es seit lange bekannt, daß unter dem Einfluß der Trypsinverdauung die Eiweißkörper weit schneller bis zu den Endprodukten abgebaut werden als durch Pepsin. Andererseits verhalten sich auch ein- und demselben Ferment gegenüber die einzelnen Eiweißkörper ganz verschieden. So wird, um nur ein Beispiel zu nennen, Serumalbumin von Pepsin viel leichter verdaut als Eiereiweiß. Es läge vielleicht am nächsten, den zeitlichen Ablauf der Stoffwechselvorgänge im Tierkörper zunächst gerade an den einzelnen Vorgängen des intermediären Stoffwechsels zu verfolgen. In der Tat liegt auf diesem Gebiete schon eine erheblichere Zahl von Einzelbeobachtungen vor. Ich erwähne nur die seit dem Vorgang von Brücke angestellten Untersuchungen über die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen fermentativen Vorgänge. Aber wenn man auch den zeitlichen Ablauf aller im Stoffwechsel sich abspielenden Umsetzungen einzeln schon endgültig zu übersehen vermöchte, so wäre damit über den wirklichen Ablauf dieser Vorgänge, wie er im Körper sich abspielt, noch kein Urteil ermöglicht. Hier werden die Verhältnisse dadurch verwickelt, daß die einzelnen Vorgänge nicht nur neben- oder nacheinander sich abspielen, sondern sich auch in hohem Maße gegenseitig beeinflussen. Darum sind die Resultate der außerhalb des Körpers angestellten Versuche nicht ohne weiteres auf den Ablauf innerhalb des Körpers zu übertragen. Während

bei einem künstlichen Verdauungsversuche die Verdauungsprodukte sich mit der Länge der Zeit anhäufen und so den weiteren Ablauf der Verdauung beeinflussen, verfügt dagegen der Körper über Mittel, um an einer Stelle entstehende Stoffe jederzeit mit dem Lymph- oder Blutstrom abzuführen oder sie an Ort und Stelle durch andere anwesende Fermente weiter umzuwandeln. Aus diesem Grunde können wir, so notwendig weitere Untersuchungen dieser Art für die Analyse des Ablaufes der Stoffwechselvorgänge im einzelnen sind, vorläufig auch die andere Methode nicht entbehren, die feststellt, welche Zeiträume zwischen der Einfuhr der Nahrungsstoffe in den Körper und dem Erscheinen der Ausscheidungsprodukte liegen.

Aus dem Gebiete des intermediären Stoffwechsels liegen einige Beobachtungen vor, aus denen ersichtlich ist, daß die einzelnen Bestandteile, aus denen sich die Nahrung des tierischen Organismus zusammensetzt, eine qualitativ und quantitativ verschiedene Reaktion des Körpers auslösen. Besonderes Aufsehen erregten in dieser Richtung die Versuche von Pawlow[1]), wonach die Kurven der nach Aufnahme der verschiedenen Nahrungsstoffe einsetzenden Sekretion der Verdauungsdrüsen verschieden ablaufen. Vom teleologischen Standpunkte betrachtet, mußte diese Tatsache auffordern zu der Frage, ob die Anpassung der Verdauungsdrüsen an die Beschaffenheit der Nahrung dazu führt, daß unter allen Umständen innerhalb einer bestimmten Zeit der gleiche Endeffekt erreicht wird. Denn eine einfache Überlegung führt zu der Forderung, daß innerhalb einer gewissen Frist, etwa binnen 24 Stunden, der Abbau der Nahrungsstoffe und speziell der Eiweißkörper im Organismus beendigt wird, da es ja sonst zu einer Aufstapelung der Eiweißkörper oder ihrer Zersetzungsprodukte im Körper kommen müßte. Auf Grund der zu jener Zeit vorliegenden Untersuchungen über diese Frage war denn auch Voit[2]) zu dem Schluß gekommen, daß selbst nach reichlicher Eiweißzufuhr die Ausscheidung des mit der Nahrung zugeführten Stickstoffs nach 24 Stunden beendigt ist. Zu einer abweichenden Anschauung kam Gruber[3]) auf Grund von eigenen im Voitschen Laboratorium angestellten Versuchen. Er fand, daß die Stickstoffausscheidung beim Hungertier nach einmaliger Fleischfütterung sehr schnell ansteigt, aber nach

[1]) Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898.

[2]) Physiologie des allgemeinen Stoffwechsels und der Ernährung, 1881, S. 107.

[3]) Zeitschr. f. Biologie 42, 407—427.

24 Stunden noch nicht zur ursprünglichen Höhe abgefallen ist. Die Ursache dieser auffallenden Erscheinung kann nach ihm nicht in einer zu langsamen Resorption gelegen sein, da die Aufsaugung beim Fleischfresser erfahrungsgemäß schneller beendigt ist. Auch um eine Erschöpfung der Zersetzungskraft kann es sich nicht handeln, da die Zersetzung durch neue Fütterung jederzeit wieder zu gewaltiger Höhe gesteigert werden kann. Unter Ausschluß anderer Möglichkeiten kommt er zu der Vermutung, daß die einzelnen bei der Verdauung entstehenden Eiweißkörper oder Abbauprodukte der Eiweißkörper nicht alle gleich leicht im Organismus zersetzt werden.

Ein verschiedenes Verhalten der Eiweißkörper in dieser Hinsicht könnte durchaus verständlich erscheinen auf Grund der neueren Erfahrung, daß die einzelnen Eiweißkörper in ihrer Zusammensetzung sehr erhebliche Verschiedenheiten aufweisen, so daß die alte, allen früheren Stoffwechselversuchen zugrunde liegende Anschauung, daß die einzelnen echten Eiweißkörper aus gleichwertigen Bausteinen zusammengesetzt seien, ja längst aufgegeben ist. Für ihre Verschiedenheit spricht ja auch, daß sie sich nicht gleichmäßig verhalten unter der Einwirkung zugesetzter Fermente. Allerdings war auch die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß die von Pawlow für verschiedene Nahrungsmittel nachgewiesene Anpassungsfähigkeit der Verdauungsdrüsen auch bei Fütterung mit verschiedenen Eiweißkörpern sich wirksam erwies. War dies der Fall, so mußte die hierbei zu beobachtende Ausscheidungskurve des Stickstoffs in den einzelnen Fällen gleich sein. Diese Frage habe ich durch den Versuch zu entscheiden mich bemüht.

Ich bin dabei in der Weise vorgegangen, daß ich zunächst die Normalkurve für einmalige Fleisch- oder Fleischfettfütterung beim Hunde festgestellt habe und weiterhin die Ausscheidungskurve bei Zusatz der einzelnen Eiweißkörper zu dieser Kost.

Dabei ging dem Versuchstage jedesmal eine Reihe Tage mit gleichmäßiger Fleisch- oder Fleischfettfütterung voraus. Der Harn wurde während des Tages in dreistündigen Zwischenräumen mit dem Katheter unter Nachspülen mit abgemessenen Mengen dünner Karbollösung gewonnen. Der Harn der Nachtzeit wurde gemeinsam entnommen und untersucht und die gefundenen Werte auf dreistündige Perioden berechnet. Im Harn wurde der Gehalt an Stickstoff und an Phosphorsäure nach den bekannten Methoden festgestellt; in mehreren Versuchen wurde auch das spezifische Gewicht durch Wägung bekannter Volumina ermittelt.

Ich gebe zunächst die bei reiner Fleischfütterung erhaltenen Resultate wieder (Versuch I).

Versuch I. 500 g Rindfleisch. (Vgl. Fig. 4.)

	Harnmenge	N g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge		
				Harn	Stickstoff	P_2O_5
1	60	2,999	0,347	24,8	15,17	15,48
2	102	4,903	0,474	14,6	24,80	21,14
3	82	4,341	0,506	20,0	21,96	22,57
4	57	2,957	0,342	13,9	14,96	15,25
5	40	1,681	0,267	9,7	8,50	11,91
6	23,3	0,962	0,102	5,7	4,87	4,55
	70	2,887	0,306	17,0	14,60	13,65
Tagesmenge	411	19,768	2,242	—	—	—

Die Resultate dieses Versuches zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den von Feder[1]) erhaltenen, der zuletzt mit derselben Methode die Kurve der Stickstoffausscheidung nach Fleischfütterung festgestellt hat. Feder fand nach Fleischfütterung einen schnellen Anstieg der Stickstoffausscheidung und zwar erreichte sie nach Fütterung mit 500 g Fleisch bei Untersuchung in zweistündigen Perioden in der dritten Periode, nach 1000 g Fleisch in der vierten Periode den Höhepunkt, verlief aber im ganzen in beiden Fällen fast ganz gleichmäßig. Danach war also ein erheblicher Wechsel in der Menge der zugeführten Nahrung nur von geringem Einfluß auf den Ablauf der Ausscheidungskurve. Bei der Fütterung mit der größeren Fleischmenge lagen die in Prozent der Tagesausscheidungen berechneten Stickstoffwerte in der ersten bis vierten Periode etwas niedriger als bei geringerer Fleischzufuhr, was Feder darauf zurückführt, daß der Darm des Hundes von 1000 g Fleisch innerhalb der gleichen Zeit nicht den gleichen Prozentsatz wie von 500 g zu resorbieren vermochte. In den mittleren Perioden lag die Kurve nach größerer Fleischfütterung etwas höher — infolge noch andauernder Resorption —, während sie in den letzten Tagesstunden unter die andere Kurve herabsank.

Als typischen Vertreter der Eiweißkörper habe ich zunächst zu meinen Versuchen das Eiereiweiß herangezogen. Ich gebe zuerst einen Versuch wieder, bei dem das Eiereiweiß koaguliert war, bei dem also der Einfluß im unkoagulierten Eiweiß vorhandener Fermente und Antifermente ausgeschaltet war.

[1]) Zeitschr. f. Biologie 17, 531—576.

An den 21 kg schweren Hund, der vorher mit 700 g Fleisch (23,8 g Stickstoff) ins Gleichgewicht gesetzt war, wurden am Versuchstage 400 g Fleisch und 80 g koaguliertes Eiereiweiß (gleich 24,1 g Stickstoff) verfüttert.

Versuch II.

400 g Rindfleisch, 80 g koag. Ovalbumin. (Vgl. Fig. 5.)

	Harnmenge	Spez. Gewicht	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesausscheidung Harnmenge	N	P_2O_5
1	51	1,0408	2,039	0,035	10,7	11,4	2,2
2	81	1,0410	2,696	0,168	17,1	15,2	10,5
3	76	1,0407	3,117	0,270	16,0	17,5	16,8
4	67	1,0413	2,569	0,306	14,1	14,4	13,1
5	66	1,0423	2,696	0,273	13,9	15,2	17,0
6	45	1,0390	1,520	0,185	9,4	8,8	11,5
	134	—	4,560	—	28,2	26,3	34,4
Tagesmenge	475	—	17,69	1,237	—	—	—

Wie ein Blick auf die Tabelle und besonders auf die Kurve (Fig. 5) lehrt, zeigt die nach Fütterung mit Fleisch und koaguliertem Eiereiweiß erhaltene Ausscheidungskurve ein ganz verschiedenes Ver-

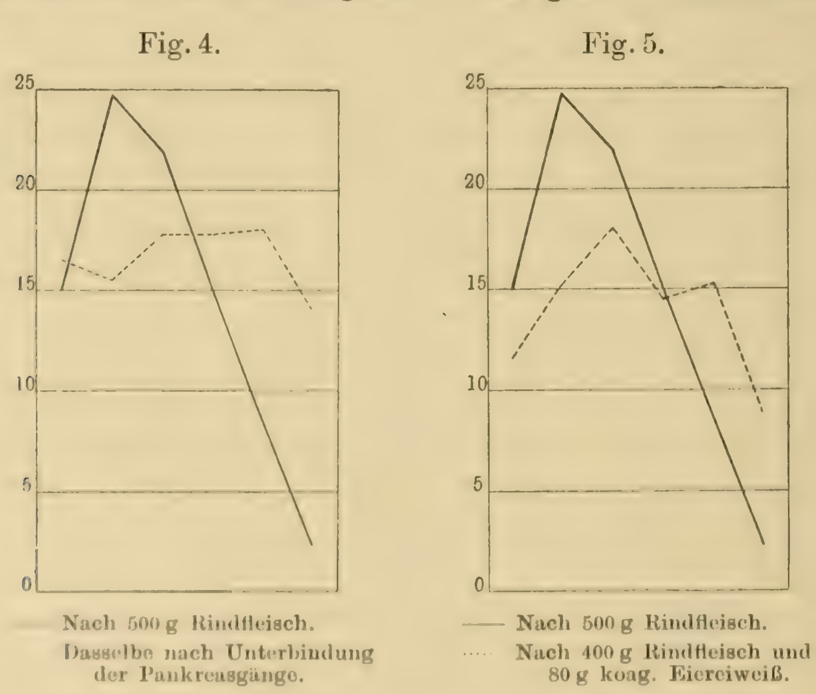


Fig. 4. Nach 500 g Rindfleisch. Dasselbe nach Unterbindung der Pankreasgänge.

Fig. 5. —— Nach 500 g Rindfleisch. ···· Nach 400 g Rindfleisch und 80 g koag. Eiereiweiß.

halten von der nach reiner Fleischfütterung beobachteten. Zur Sicherung dieses Ergebnisses kann ich noch über einige weitere Versuche mit Fütterung von Eiereiweiß berichten. Da aber in diesen Versuchen gleichzeitig kleine Fettmengen verfüttert wurden,

so muß ich zunächst den Einfluß des Fettes auf die uns eben beschäftigenden Verhältnisse erörtern. Die Zugabe von Fett geschah aus dem Grunde, weil ich den fettfreien Eiweißkörper der vorher gereichten fetthaltigen Nahrung zulegte. Gerade bei der auffallenden Form der im ersten Versuch erhaltenen Ergebnisse erschien es außerdem wünschenswert, durch Darreichung einer gemischten Nahrung die natürlichen Verhältnisse möglichst inne zu halten.

Schon Panum[1]) hat gezeigt, daß die Zugabe von Fett zum Fleisch die Kurven der Harnstoffausscheidung in ihrer Form beeinflußt. Er beobachtete, daß nach Fütterung von 500 g Pferdefleisch und nur 30 g Fett das Maximum der Stickstoffausscheidung auf die sechste bis achte Stunde hinausgeschoben wurde und daß in der zweiten Hälfte des Versuchstages die Harnstoffausscheidung größer war als bei reiner Fleischfütterung. Feder hat die Versuche von Panum wiederholt, aber größere Mengen von Fett im Verhältnis zum Fleisch gereicht. Das Resultat war dasselbe, nur ausgeprägter, so daß Feder den Satz aufstellt: „Je größer die gefütterte Fettmenge im Verhältnis zur gereichten Fleischmenge ist, desto gleichmäßiger scheint die Stickstoffausscheidung in den verschiedenen Tagesperioden sich zu gestalten.“

Versuch III. 500 g Rindfleisch, 40 g Fett. (Vgl. Fig. 6.)

	Harnmenge	N g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesausscheidung Harn	N	P_2O_5
1	24	1,7013	0,230	7,7	9,09	9,25
2	55	2,8181	0,540	17,7	15,05	21,72
3	66	3,6785	0,598	21,3	19,65	24,05
4	49	2,6912	0,412	15,8	14,37	16,57
5	38	1,7968	0,248	12,3	9,598	9,98
6 {	78	6,036	0,460	25,2	32,239	18,50
	26	2,012	0,120	8,4	10,745	6,17
Tagesmenge	310	18,72	2,486	—	—	—

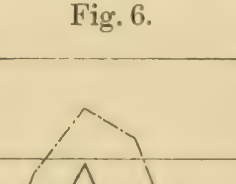
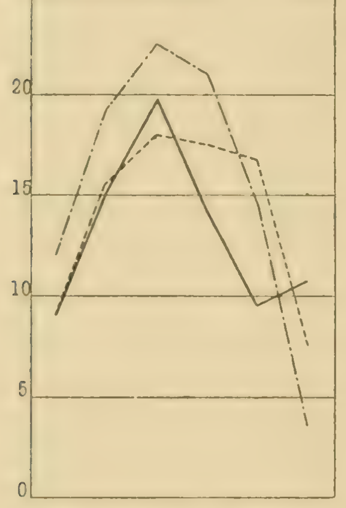
Die „nivellierende Wirkung des Fettes“ zeigt sich auch deutlich ausgeprägt in dem nebenstehenden Versuche mit Fütterung von 500 g Fleisch und 40 g Fett, wenn sie auch entsprechend der kleineren Fettzulage viel geringer ausfällt als in Feders Versuchen. Der Höhepunkt der Stickstoffausscheidung erscheint nicht,

[1]) Nord. med. Arkiv 6, Nr. 12 (1874).

wie nach Fütterung mit Fleisch allein, in der zweiten, sondern erst in der dritten Periode und bleibt auch in seiner Größe beträchtlich hinter jenem zurück. Andererseits hält sich die Stickstoffausscheidung gegen Ende des Versuches viel höher als bei reiner Fleischfütterung.

Welchen Einfluß hat nun die Zugabe von Eiereiweiß auf die Gestalt der nach Fütterung mit Fleisch und Fett zu beobachtenden Kurven? Wie aus Tabelle IV hervorgeht, zeigt sich auch unter diesen Umständen eine deutliche Verschiedenheit in der Zersetzungskurve des Eiereiweißes von der nach reiner Fleisch-Fettfütterung erhaltenen. (Das Eiereiweiß kam diesmal in unkoaguliertem Zustande zur Verwendung.) In beiden Fällen steigt die Kurve zunächst gleichmäßig an und erreicht auch innerhalb derselben Zeit den Gipfelpunkt. Das Maximum liegt nach Eiweißfütterung etwas niedriger, dann aber hält sich hier die Ausscheidung durch zwei weitere Perioden auf annähernd gleicher Höhe und fällt erst dann steil ab.

Fig. 6.

—— Nach 500 g Rindfleisch u. 40 g Fett.
Nach 500 g Rindfleisch, 50 g Fett u. 50 g unkoag. Eiereiweiß.
—·—· Nach 200 g Rindfleisch, 15 g Fett, 40 g unkoag. Eiereiweiß.

Ein entsprechender Einfluß des Zusatzes von unkoaguliertem Eiereiweiß läßt sich auch im folgenden Versuche (5) erkennen, bei dem die verfütterte Fleischmenge erheblich kleiner war, so daß eher ein beschleunigter Ablauf der Zersetzung zu erwarten gewesen wäre.

Versuch IV. 500 g Rindfleisch, 50 g Fett, 50 g unkoag. Ovalbumin. (Vgl. Fig. 6.)

	Harnmenge	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge		
				Harn	Stickstoff	P_2O_5
1	48	1,891	0,198	10,5	9,20	7,34
2	78	3,165	0,597	17,0	15,40	22,14
3	87	3,695	0,564	19,0	17,98	20,92
4	78	3,636	0,398	17,0	17,69	14,76
5	69	3,473	0,320	15,1	16,90	11,87
6 {	33	1,564	0,206	7,1	7,61	7,65
	98	4,692	0,619	21,4	22,83	22,96
Tagesmenge	458	20,552	2,696	—	—	—

Versuch V. 200 g Rindfleisch, 15 g Fett, 40 g unkoag. Ovalbumin. (Vgl. Fig. 6.)

	Harnmenge	N g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge N	In Prozent der Tagesmenge P_2O_5
1	52	1,061	0,087	12,17	11,85
2	52	1,681	0,153	19,29	19,90
3	45	1,874	0,188	22,52	24,45
4	38	1,859	0,118	21,33	15,34
5	?	1,274	0,184	14,62	23,95
6	73	0,322	0,013	3,695	1,69
	22	0,966	0,039	11,084	5,071
Tagesmenge	—	8,715	0,769	—	—

Im ausgesprochenen Gegensatz zu der nach Zulage von Ovalbumin erhaltenen Exkretionskurve stehen die nach Fütterung mit Edestin und mit Nutrose [1]) auftretenden. Worauf es beruht, daß nach Edestin die Stickstoffausscheidung in den ersten beiden Perioden so niedrig bleibt, wodurch das Maximum auf die vierte Periode hinausgeschoben wird, vermag ich vorläufig nicht zu entscheiden. Weitere Versuche müssen lehren, ob es sich hier um eine gesetzmäßige Erscheinung handelt. In ihrem ganzen Verlaufe, dem steilen Gipfel und plötzlichen Abfall, entspricht auch die Edestinkurve mehr der nach reiner Fleischfütterung beobachteten als der Eiereiweißkurve.

Versuch VI. 500 g Fleisch, 50 g Fett, 50 g Edestin. (Vgl. Fig. 7.)

	Harnmenge	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge Harn	In Prozent der Tagesmenge Stickstoff	In Prozent der Tagesmenge P_2O_5
1	36	1,816	0,115	9,39	9,74	4,29
2	80	1,967	0,608	18,80	10,55	22,71
3	94	4,077	0,640	22,09	21,86	23,90
4	82	4,340	0,504	19,25	23,27	18,82
5	52,5	3,036	0,325	12,22	16,28	12,14
6	27	1,137	0,162	6,34	6,10	6,04
	81	3,412	0,485	19,03	18,29	18,12
Tagesmenge	372	—	—	—	—	—

[1]) Für die Überlassung größerer Mengen von Edestin und Nutrose bin ich den Höchster Farbwerken vorm. Meister, Lucius und Brüning zu Dank verpflichtet.

Versuch VII. 500 g Rindfleisch, 50 g Fett, 50 g Nutrose. (Vgl. Fig. 7.)

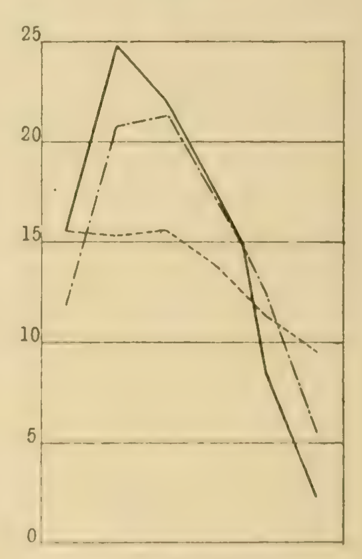
	Harnmenge	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge Harn	N	P_2O_5
1	65	2,502	0,426	13,2	10,61	10,78
2	99	4,021	0,732	20,2	17,05	18,53
3	83	6,404	1,068	16,9	27,15	27,03
4	75[1]	3,190	0,508	15,3	13,52	12,86
5	82	3,293	0,495	16,7	13,96	12,53
6	29	1,393	0,241	5,9	5,91	6,09
	87	4,179	0,722	17,8	17,72	18,27
Tagesmenge	491	23,589	3,951	—	—	—

Die deutliche Beeinflussung der Ausscheidungskurve, die auf Fettzulagen eintrat, mußte zu Versuchen darüber auffordern, ob die Kohlenhydrate eine ähnliche Wirkung auszuüben imstande sind, wie es zu erwarten war, wenn die Wirkung der Fette nur auf

Fig. 7.

—— Nach 500 g Rindfleisch u. 40 g Fett.
- - - Nach 500 g Rindfleisch, 50 g Fett, 50 g Edestin.
-·-·- Nach 500 g Rindfleisch, 50 g Fett u. 50 g Nutrose.

Fig. 8.



—— Nach 500 g Rindfleisch.
- - - Nach 500 g Rindfleisch, 150 g Reismehl.
-·-·- 500 g Rindfleisch, 100 g Reis.

ihrem kalorischen Gehalt beruhte. Ich habe zwei Versuche mit Zufütterung von Reis und von Reismehl angestellt, die ich zunächst wiedergebe. In dem einen Versuche wurde, um einen Vergleich mit dem von mir angestellten Fleischfettversuch zu ermöglichen,

[1]) Kleiner Harnverlust beim Katheterisieren.

eine der Fettmenge kalorisch ungefähr entsprechende Menge Reis zugeführt, im zweiten Versuche dagegen zur Erzielung eines möglichst deutlichen Ausschlages eine etwas größere Menge.

Versuch VIII. 500 g Fleisch, 100 g Reis. (Vgl. Fig. 8.)

	Harn	Spez. Gewicht	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge Harn	Stickstoff	P_2O_5
1	41	1,0276	1,432	0,015	5,9	11,86	1,23
2	103	1,0120	2,516	0,106	15,0	20,83	10,98
3	120	1,022	2,583	0,304	17,4	21,39	25,00
4	110	1,0164	2,067	0,288	16,0	17,11	23,68
5	94	1,0166	1,466	0,210	13,7	12,15	17,27
6	73	1,0150	0,671	0,097	10,7	5,56	8,03
	220	—	2,014	0,293	32,0	16,67	24,10
Tagesmenge	688	—	12,078	1,216	—	—	—

Versuch IX. 700 g Fleisch, 150 g Reismehl. (Vgl. Fig. 8.)

	Harn	Spez. Gewicht	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge Harn	N	P_2O_5
1	94	1,0382	3,583	0,144	15,5	15,5	4,8
2	95	?	3,500	0,384	15,6	15,2	14,0
3	80	1,0454	3,572	0,644	13,2	15,5	21,7
4	81	1,0442	3,145	0,452	13,3	13,7	15,2
5	75	1,0416	2,603	0,375	12,3	11,3	12,6
6	61	1,0413	2,224	0,324	10,03	9,6	10,7
	183	—	6,672	0,972	30,1	28,8	32,0
Tagesmenge	608	—	23,07	2,971	—	—	—

Der von Pawlow aufgefundenen Verschiedenheit der Drüsensekretion nach Fütterung verschiedener Nahrung entspricht also auch ein verschiedenes Endergebnis, gemessen in der Stickstoffausscheidung im Harn. Es liegt also nahe, diese beiden Erscheinungen in direkte Beziehung zu einander zu bringen. Der Zusammenhang könnte so gedacht werden, daß bei geringerer Arbeitsleistung der Verdauungsdrüsen längere Zeit vergeht, bis die betreffenden Nahrungsstoffe resorbiert und abgebaut werden. Eine andere Möglichkeit wird nahe gelegt durch die aus Pawlows Laboratorium hervorgegangenen Arbeiten von Rjasantzeff[1]) und von

[1]) Jahresbericht für Tierchemie 26, 349—351.

Schepski[1]). Beide fanden, daß die Mehrausscheidung von Stickstoff im Harn innerhalb der ersten sechs bis acht Stunden nach der Nahrungsaufnahme in direktem Verhältnis zu der Arbeit der Verdauungsdrüsen steht, so daß die Mehrausscheidung von Stickstoff nach ihnen als Maß der Verdauungsarbeit, die zur Aufnahme des Nahrungstickstoffs nötig ist, oder mit anderen Worten als Maß der Verdaulichkeit verschiedener Nahrung dienen kann. Nach Scheinfütterung trat entsprechend der dadurch ausgelösten Sekretion der Magendrüsen und des Pankreas eine bedeutende Steigerung der Stickstoffausscheidung im Harn auf; dagegen war die Mehrausscheidung nur gering, wenn Lösungen von Eiereiweiß oder von Blutserum unter bestimmten Vorsichtsmaßregeln in den Magen gebracht wurden. Wenn gleiche Mengen Stickstoff z. B. in Form von Brot oder von Milch oder Fleisch gefüttert wurden, so nahm die Stickstoffausscheidung im Harn nicht gleichmäßig zu, sondern verschieden, je nach der sekretorischen Arbeit der Verdauungsdrüsen.

Nun ist zwar nach den Versuchen mit Scheinfütterung nicht wohl zu bezweifeln, daß tatsächlich die vermehrte Sekretionstätigkeit von einer vermehrten Stickstoffausscheidung im Harn begleitet ist, obwohl der Zusammenhang zwischen diesen beiden Vorgängen nicht ohne weiteres zu übersehen ist. Es ist aber andererseits einleuchtend, daß eine vermehrte Sekretion der Verdauungsdrüsen zu einer beschleunigten Aufspaltung und Aufsaugung der Eiweißkörper führen muß, und es dürfte nahe liegen, hierin den Grund zu sehen dafür, daß die Vermehrung der Stickstoffausscheidung im Harn nach Darreichung verschiedener Nahrung der im einzelnen Falle ausgelösten Sekretion der Verdauungsdrüsen entspricht.

Dafür, daß die Einwirkung der Verdauungsdrüsen auf die Nahrung von erheblicher Bedeutung für den Ablauf der Stickstoffausscheidung im Harn ist, was ja von vornherein zu erwarten war, kann ich einige Versuche als Beleg anführen, in denen durch Unterbindung der Ausführungsgänge des Pankreas das Sekret dieser Drüse vom Darm ferngehalten wurde.

Das Resultat ist auch in diesem Falle ein viel gestreckterer Verlauf der Ausscheidungskurve, was deutlich hervortritt bei dem Versuch, bei dem die Absperrung des Pankreassekrets vom Darm nach Ausweis des Resorptionsversuches vollständig gelungen war. (Vgl. Fig. 4.) In dem anderen Versuche dagegen, bei dem sich

[1]) Jahresbericht für Tierchemie 30, 711.

die Resorption trotz Unterbindung von zwei Ausführungsgängen kaum geschädigt zeigte, findet sich auch nur eine gewisse Sprunghaftigkeit der Ausscheidung, während sonst die Kurve in ihrem Ablauf der gewöhnlichen Kurve nach Fleischfütterung entspricht.

Versuch X. 500 g Fleisch.
Pankreasgänge unterbunden (unvollständig).

	Harn	Spez Gewicht	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge N	In Prozent der Tagesmenge P_2O_5
1	35	1,0330	1,980	0,231	14,43	12,5
2	34	1,0316	2,654	0,320	9,35	17,3
3	65	?	3,117	0,381	22,72	20,6
4	12	1,0311	1,508	0,165	10,99	8,93
5	?	1,0304	2,033	0,384	14,82	20,8
6 {	6	1,0272	0,809	0,122	5,90	6,6
	18	—	2,426	0,366	17,69	19,8
Tagesmenge	—	—	13,718	1,847	—	—

Versuch X. 500 g Fleisch. (Vgl. Fig. 4.)
Pankreasgänge unterbunden.

	Harn	Spez. Gewicht	Stickstoff g	P_2O_5 g	In Prozent der Tagesmenge Harn	In Prozent der Tagesmenge N	In Prozent der Tagesmenge Phosphor
1	43	1,0534	2,258	0,295	13,1	16,5	13,7
2	57	1,0481	2,885	0,393	17,3	15,5	18,3
3	60	1,0452	2,857	0,420	18,2	17,8	19,5
4	53	?	2,839	0,348	16,1	17,9	16,2
5	58	1,0424	2,447	0,300	17,6	18,1	14,0
6 {	19,3	1,0441	0,879	0,131	5,9	4,7	6,1
	58	—	2,637	0,393	17,6	14,1	18,3
Tagesmenge	329	—	15,953	2,149	—	—	—

Dies Ergebnis der Versuche mit Unterbindung der Pankreasgänge und die Ähnlichkeit der hierbei gewonnenen Stickstoffkurve mit der nach Eiereiweiß und nach Fett und Kohlehydraten beobachteten schien darauf hinzuweisen, daß die gemeinsame Ursache dieser Erscheinungen in verzögerter Resorptionsgeschwindigkeit gelegen sein könnte. Damit war die Möglichkeit gegeben, daß die verzögerte Stickstoffausscheidung sich auch bei Verfolgung in längeren 24stündigen Perioden noch würde nachweisen lassen.

Ich habe einige orientierende Versuche in dieser Richtung angestellt, die ich hier kurz anführen möchte.

Entsprechende Versuche sind schon von Falta[1]) beim Menschen angestellt worden, nachdem er bei Verfolgung des Einflusses der Zulage verschiedener Eiweißkörper zu einer sonst gleichmäßigen Kost auf die Ausscheidung von Homogentisinsäure beobachet hatte, daß der auf diese Weise eingeführte Stickstoff innerhalb verschieden langer Zeit ausgeschieden wurde. Diese an einem Kranken mit Alkaptonurie gemachten Beobachtungen hat er dann weiterhin durch Versuche an gesunden Menschen bestätigt und erweitert. Er konnte die von ihm untersuchten Eiweißkörper nach der Leichtigkeit, mit der sie zersetzt wurden, in folgender Reihe ordnen: Leim, Kaseïn, Serumalbumin, Fibrin, Blutglobulin, Hämoglobin, Ovovitellin (?), genuines Eiereiweiß. Während beim Leim und beim Kaseïn die Stickstoffausscheidung schon am ersten Tage den Höhepunkt erreichte und nach zwei Tagen fast wieder zur ursprünglichen Größe zurückgekehrt war, fiel bei Verabreichung von genuinem Eiereiweiß der Gipfelpunkt der Kurve auf den zweiten Tag und die Kurve erreichte erst nach vier Tagen annähernd die gewöhnliche Höhe. Falta teilt auch einige am Hunde angestellte Versuche mit, bei denen es ihm nicht gelang, einen deutlichen

Versuch XI. Zulage von Ovalbumin.

Datum	Körpergewicht	N im Harn	P_2O_5 im Harn	Bemerkungen
8. III.	13,420	13,9	1,65	500 g Pferdefleisch, 100 g Schmalz
9. "	13,720	12,8	1,47	
10. "	14,150	14,0	1,29	
11. "	14,300	16,0	1,51	Zulage von 50 g unkoaguliertem Ovalbumin
12. "	14,400	14,1	1,46	
13. "	14,450	14,8	1,62	
14. "	14,600	12,9	1,68	
15. "	14,750	13,5	1,65	
16. "	14,800	13,6	1,71	
17. "	14,900	14,1	1,80	
18. "	15,00	14,0	1,67	
19. "	15,150	14,0	1,68	
20. "	?	?	?	Zulage von 50 g koaguliertem Ovalbumin. — Erbrechen
21. "	14,870	18,1	2,13	
22. "	15,110	15,8	1,79	
23. "	15,400	14,1	1,71	

[1]) Deutsches Archiv für klin. Medizin 81, 1904 und 86, 1906.

Versuch XII. Zulage von Nutrose.

Datum	Körpergewicht	N im Harn	P_2O_5 im Harn	Harnmenge	Nahrung
4. IV.	15,900	16,75	2,42	360	500 g Pferdefleisch, 25 g Speck
5. „	15,900	16,40	2,47	350	
6. „	15,800	16,65	2,36	400	
7. „	15,700	19,96	2,89	360	Zulage von 50 g Nutrose
8. „	15,820	17,49	2,38	360	
9. „	15,750	16,76	2,35	420	
10. „	15,770	15,95	2,30	380	
11. „	15,770	17,01	2,42	350	
12. „	15,750	16,28	2,25	330	
13. „	15,800	17,43	2,44	350	
14. „	15,750	17,11	2,25	330	

Versuch XIII. Zulage von Nutrose.

Datum	Körpergewicht	N im Harn	P_2O_5 im Harn	Bemerkungen
24. IV.	7150	10,33	1,46	300 g Pferdefleisch, 40 g Fett
25. „	7000	9,94	1,40	
26. „	7100	10,02	1,38	
27. „	7120	10,25	1,45	
28. „	7130	10,16	1,34	
29. „	7300	14,23	1,93	Zulage von 50 g Nutrose
30. „	7250	11,48	1,48	
1. V.	7170	10,25	1,34	
2. „	?	10,23	1,41	
3. „	7270	10,15	1,38	
4. „	7300	10,67	1,36	

Versuch XIV. Zulage von Edestin.

Datum	Körpergewicht	N im Harn	P_2O_5 im Harn	Bemerkungen
9. VI.	12,000	12,80	1,78	400 g Pferdefleisch, 40 g Fett
10. „	12,070	12,58	1,73	
11. „	12,150	12,38	1,55	
12. „	12,240	12,77	1,78	
13. „	12,300	13,49	1,45	Zulage von 50 g Edestin
14. „	12,320	18,33	1,78	
15. „	12,350	11,40	1,42	
16. „	12,300	12,91	2,25	
17. „	—	12,07	1,50	

Unterschied im Verhalten der verschiedenen Eiweißkörper festzustellen. Nach meinen Versuchen möchte ich es doch für möglich halten, daß ein solcher Unterschied besteht, wenn er auch vielleicht nicht regelmäßig zu beobachten ist.

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, wurde der in Form von Nutrose zugelegte Stickstoff ziemlich schnell ausgeschieden, so daß die Mehrausscheidung von Stickstoff nach zwei Tagen beendet war. Auch nach Zulage von Edestin war die Vermehrung der Stickstoffausscheidung nach zwei Tagen schon abgeklungen, wobei auffallenderweise die Hauptausscheidung erst auf den zweiten der Fütterung folgenden Tag fällt, während sie in einem anderen hier nicht mitgeteilten Versuche schon innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgte. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Nutrose und Edestin zeigt sich nach Zulage von Eiereiweiß eine verlangsamte Ausscheidung, so daß die Stickstoffkurve erst am vierten Tage wieder die Höhe der Vor- und Nachperiode erreicht.

Im Anschluß an diese Versuche möchte ich noch kurz zwei andere anführen, bei denen ich versuchte, die verlangsamte Stickstoffausscheidung nach Eiereiweißfütterung auch am Menschen festzustellen, wie ich gleich bemerken will, ohne Erfolg. In beiden Versuchen kam nur ein geringer Bruchteil des mit dem Eiereiweiß zugeführten Stickstoffs im Harn zur Ausscheidung. In beiden Versuchen waren die Stickstoffverluste im Kot ziemlich hoch, so daß zumal für den ersten Versuch anzunehmen ist, daß nur ein geringer Bruchteil des Eiereiweiß resorbiert wurde. Mit Sicherheit läßt sich darüber nichts aussagen, weil die Abgrenzung des Kotes für einen Tag nicht versucht wurde.

S., 22 Jahre alt, hat vor Beginn des Versuches einen leichten Gelenkrheumatismus des rechten Kniegelenks durchgemacht, der jetzt geheilt ist; er hat eine gut kompensierte Mitralinsuffizienz. Keinerlei subjektive Verdauungsstörungen. Die Kost bestand aus 800 ccm Kaffee, 300 ccm Milch, 500 ccm Fleischbrühe, 400 ccm Rotwein, 50 g Butter, 50 g Zucker, 30 g Speck, 120 g Reis und 200 g Rindsfilet, mit einem (berechneten) Stickstoffgehalt von 11,2 g. Der Kot wurde für zwei Perioden abgegrenzt. Am 26. März wurden zur Kost 80 g nicht koaguliertes Eiereiweiß zugelegt, entsprechend 10,62 g Stickstoff, in einzelnen Portionen über den Tag verteilt.

Die mittlere tägliche Stickstoffausscheidung im Harn berechnet sich für die Vorperiode zu 10,33 und für die Nachperiode (die letzten fünf Tage des Versuches) zu 10,71 g. Daraus ergibt sich für den Versuchstag selbst eine Mehrausscheidung von 1,7 g Stickstoff, während die nächsten Tage sich von der mittleren Stickstoffausscheidung nur mehr um solche Werte entfernen, wie sie den auch bei gleichmäßiger Nahrungsaufnahme nicht zu vermeidenden Schwankungen entsprechen. Bei vollständiger Resorption und

Wiederausscheidung des Eiereiweißstickstoffs wäre zu erwarten gewesen eine Mehrausscheidung von 10,62 g im Harn. Da dem Gesamtstickstoffgehalt der Nahrung von 111,8 g ein Verlust von 20,5 g mit dem Kot, von 108,04 g durch den Harn gegenübersteht, wurden vom Körper 16,79 g Stickstoff abgegeben. Das Körpergewicht blieb während des Versuches unverändert (70,3 kg zu Anfang und 70,4 zu Ende des Versuches). Die gesamte Stickstoffeinfuhr betrug 111,8 g, die gesamte Ausfuhr im Kot 20,55 g, woraus sich ein Stickstoffverlust von 18,4 Proz. durch den Kot berechnet.

Datum	Harnmenge	Spez. Gewicht	Stickstoff im Harn	Stickstoff im Kot	P_2O_5 im Harn	Kost
25. I.	1550	1015	9,52	2,24	1,610	
26. „	1590	1015	11,18	2,24	1,520	
27. „	1570	1014	10,28	2,24	1,430	
28. „	1200	1020	12,22	2,24	1,470	Zulage von 80 g unkoag. Eiereiweiß
29. „	1160	1018	11,29	1,93 (29. I.–3. II.)	1,260	
30. „	1130	1019	11,40		1,540	
31. „	1550	1012	9,55		1,540	
1. II.	1550	1014	11,23		1,780	
2. „	1570	1017	11,63		1,820	
3. „	1370	1015	9,74		1,480	

A. S., 15 Jahre alt, hat eine Lungenentzündung überstanden; seit 12 Tagen fieberfrei. Keinerlei Beschwerden an den Verdauungsorganen. Die Kost bestand aus 500 ccm Kaffee, 350 ccm Milch, 500 ccm Fleischbrühe, 200 g Weißbrot, 100 g Filet, 100 g Kartoffelbrei, zwei Eiern, 40 g Zucker, 50 g Butter, entsprechend einem (berechneten) Gehalt an Stickstoff von 11,3 g. Am vierten Versuchstage wurden zur Kost 70 g unkoaguliertes Eiereiweiß, entsprechend 9,3 g Stickstoff, zugelegt.

Datum	Harnmenge	Spez. Gewicht	Stickstoff im Harn g	Stickstoff im Kot g	Phosphorsäure im Harn g	Kost
3. IV.	1010	1020	12,55	0,93 (3.–5. IV.)	2,395	
4. „	930	1022	11,96		2,19	
5. „	930	1021	11,71		2,12	
6. „	1370	1018	12,97	0,83 (6.–11. IV.)	1,95	Zulage v. 70 g Eiereiweiß, entspr. 9,3 g Stickstoff
7. „	1140	1018	10,44		1,68	
8. „	1050	1020	10,87		2,01	
9. „	1040	1019	10,90		1,89	
10. „	1390	1016	11,78		1,80	
11. „	2080	?	11,54		1,86	

Da die Vorperiode anscheinend noch etwas unter dem Einfluß der voraufgegangenen Ernährung steht, habe ich die mittlere Stickstoffausscheidung aus der Nachperiode berechnet und zwar aus den letzten vier

Versuchstagen zu 11,27 g. Daraus ergibt sich eine Mehrausscheidung am Tage der Zulage von 1,7 g Stickstoff anstatt der zu erwartenden von 9,3 g. Die Stickstoffzufuhr betrug im ganzen 109,91 g, die Stickstoffausfuhr im Kot betrug 7,75 g, entsprechend einem Verlust von 8,52 Proz. der Einfuhr. Es bestand nahezu Stickstoffgleichgewicht (— 2,56 g).

Wenn es auch in diesen Versuchen nicht gelang, die verlangsamte Eiweißzersetzung auch für den Menschen nachzuweisen, so kann doch nach den von Falta mitgeteilten Protokollen kein Zweifel sein, daß auch für den Menschen ein Unterschied in der Zersetzlichkeit der verschiedenen Eiweißkörper besteht.

Während nach meinen zuerst mitgeteilten Versuchen die größte Wahrscheinlichkeit dafür sprach, daß die nach Eiereiweiß und nach Fett- und Reisfütterung eintretende verspätete Stickstoffausscheidung ihren Grund in einer verlangsamten Resorption hatte, haben Feder und Falta für ihre Versuche diese Erklärung abgelehnt. Feder glaubt als Ursache der verzögerten Stickstoffausscheidung nach Fettzulage zum Fleisch eine geänderte Zersetzungskraft der Zellen des Organismus unter der Einwirkung des Fettes ansehen zu müssen. Eine verzögerte Resorption kann nach ihm nicht als Ursache angesehen werden, da nach den Versuchen von Schmidt-Mülheim[1]) die Resorption des Fleisches schnell abläuft und da nach Rubner Zusatz von Fett zur Fleischkost die Resorption des Eiweiß nicht vermindert, sondern eher begünstigt. Im Sinne dieser Ansicht Feders scheint zu sprechen, daß Kohlehydrate als Zulage zum Fleisch eine gleichsinnige Wirkung wie Fett ausüben. Dagegen ist es auf Grund dieser Anschauung von vornherein weniger verständlich, daß die Zulage von Eiereiweiß denselben Einfluß wie die von Fett und Kohlehydrat ausüben sollte, während ein solcher anderen Eiweißkörpern wie Nutrose und Edestin abgeht.

Auch Falta erörtert die Ursachen der auffallenden Verschiedenheit in dem Verhalten der einzelnen Eiweißkörper im Stoffwechsel. Er weist die Annahme zurück, daß die langsame Ausscheidung des Eiereiweiß ihren Grund in einer verzögerten Aufsaugungsgeschwindigkeit haben könnte, da sich sonst die Resorption auf einen Zeitraum von mehreren Tagen erstreckt haben müßte. Auch ein verschiedener Gehalt der einzelnen Eiweißkörper an den größeren Bausteinen des Eiweißmoleküls kann nach ihm die Ursache nicht sein, da z. B. Kaseïn und Leim gleiche Ausscheidungsgeschwindigkeit haben, sich aber in ihrer Zusammen-

[1]) Archiv für Anatomie und Physiologie 1879, S. 39—58.

setzung stark unterscheiden. Dagegen könnte nach ihm der Grund darin zu finden sein, daß die Zersetzung der einzelnen Eiweißkörper im Magendarmkanal verschieden weit geht, so daß sie zum Teil in Form einfacher Spaltprodukte, zum Teil als höhere, dem Eiweiß noch näher stehende Gruppen resorbiert würden.

Diese seine Annahme eines stufenweisen Abbaues der Eiweißkörper sucht Falta durch eine Reihe von Gründen zu stützen, von denen ich einige hier anführen will. So spricht für sie der von Rubner[1]) und von Frank und Trommsdorf[2]) gefundene verschiedene Verlauf der Ausscheidungskurven des Kohlenstoffs und des Stickstoffs nach Fleischfütterung, desgleichen auch die verschiedene Geschwindigkeit, mit der nach Eiweißfütterung einerseits die Homogentisinsäure, andererseits der Stickstoff im Harn erscheint. So wurde nach Zulage von Eiereiweiß die daraus stammende Homogentisinsäure schon innerhalb 24 Stunden ausgeschieden, während sich die entsprechende Stickstoffausscheidung auf die fünffache Zeit erstreckte. Falta vermutet, daß dieser stufenweise Abbau schon diesseits der Darmwand vor sich geht, also schon vor der Resorption, weil schon bloße Zustandsänderungen des Eiweiß den größten Einfluß auf die Geschwindigkeit der Zersetzung ausüben. Denn die langsame Ausscheidung gilt nach ihm nur für genuines, nicht für koaguliertes Eiereiweiß. Diesen Unterschied habe ich allerdings in meinen Versuchen mit Beobachtung kürzerer Zeiträume nicht wiederfinden können.

Wenn auch eine verlangsamte Resorption als alleinige Erklärung der von Falta beobachteten verlangsamten Stickstoffausscheidung nach Eiereiweiß zunächst wenig Wahrscheinlichkeit für sich hat, so schien sie mir doch für die innerhalb der ersten 24 Stunden zu beobachtenden Wirkungen nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden zu können. Liegen doch bereits einige Beobachtungen über den Einfluß von Fettfütterung auf die Verdauungsorgane vor, die eine verzögernde Wirkung auf die Resorption durchaus wahrscheinlich machen. So hat Otto Frank[3]) gefunden, daß verfütterte Fettsäuren auffallend lange im Magendarmkanal liegen bleiben; es fanden sich z. B. nach $21^1/_2$ Stunden dauernder Verdauung im Magen noch 5,3 Proz. der verfütterten Fettsäuren vor. Besonders wichtig aber sind in diesem Zusammen-

---

[1]) Beiträge zur Physiologie, Karl Ludwig gewidmet, 1887.
[2]) Zeitschr. f. Biologie 43, 258—287.
[3]) Archiv für Anatomie und Physiologie 1894, S. 297—308.

hange die Beobachtungen von Pawlow über den Einfluß des Fettes auf die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Denn nach ihm übt Fett nicht nur ebensowenig wie Stärke einen Reiz auf die Magendrüsen aus, es bewirkt sogar, wenn es vor oder nach Fleischfütterung gegeben wird, eine starke Hemmung der sonst auf Fleisch eintretenden Sekretion. Dieselbe Hemmung durch Fett ließ sich auch für die auf Scheinfütterung eintretende „psychische“ Sekretion nachweisen. Daß diese Wirkung des Fettes auch beim Menschen eintritt, haben unter anderem Strauss und Aldor[1]) gezeigt. Ich habe es deshalb für wünschenswert gehalten, direkte Versuche über den Ablauf der Resorption nach Zulage von Fett zum Fleisch und nach Eiereiweiß anzustellen.

Bei diesen Versuchen habe ich mich an die Versuchsanordnung von Schmidt-Mülheim angelehnt. Hunde von annähernd gleichem Gewicht mußten zwei Tage hungern, wurden am dritten Tage gefüttert und eine bestimmte Zeit nachher in leichter Narkose durch Verbluten getötet. Der Inhalt des Magens und des Dünndarms wurden für sich möglichst vollständig gewonnen, was beim Magen keine Schwierigkeiten bot, für den Darm am besten durch vorsichtiges Abstreifen der Schleimhaut zwischen den Fingern unter wiederholter Bespülung mit phys. Kochsalzlösung gelang. Der Inhalt von Magen und Darm wurde dann bei schwach essigsaurer Reaktion in der Siedehitze koaguliert und im Filtrat der Stickstoff bestimmt. Der feste Rückstand wurde im Heißluftschrank bei 100° durch mehrere Tage getrocknet und dann sein Stickstoffgehalt bestimmt.

1. Junger Terrier, getötet 4 Stunden nach Fütterung mit 200 g Fleisch, 50 g Fett. Mageninhalt 205,5 g, Darminhalt 86,5 g. Der Mageninhalt wurde durch Ausschütteln mit Äther zunächst von der Hauptmenge des Fettes befreit. Ein Teil des Darminhaltes, darunter der ganze feste Rückstand nach Koagulation ging verloren, so daß die für die Resorption gefundene Zahl zu groß ausfällt. Trockenrückstand im Magen 26,065 g mit 13,596 Proz. = 3,543 g N, Magenfiltrat 250 ccm = 0,667 g N, Darmfiltrat (Rest) 0,3243 g N.

2. Hund von 8,8 kg, getötet 6 Stunden nach Fütterung mit 200 g Fleisch, 50 g Fett. Einige Bandwurmglieder im Dünndarm. Darmschleimhaut von normalem Aussehen. Mageninhalt riecht stark ranzig, 220,5 g. Darminhalt 48,5 g. Letzterer im ganzen getrocknet, weil er auch nach Ausschütteln mit Äther nicht filtriert. Fester Rückstand im Magen 34,154 g mit 12,13 Proz. N = 4,143 g N, Magenfiltrat 250 ccm = 0,526 g N, Trockenrückstand des Darminhaltes 13,3068 g mit 6,05 Proz. = 0,865 g N.

3. Hund von 5 kg, getötet 4 Stunden nach Fütterung mit 100 g Fleisch, 25 g unkoaguliertem Eiereiweiß. Mageninhalt 62 g, Darminhalt 88 g. Im Dünndarm einige Bandwurmglieder. Fester Rückstand im Magen 5,7713 g mit 8,77 Proz. = 0,5059 g N, im Darm 17,1539 g mit 12,3 Proz. = 2,109 g N, Magenfiltrat = 0,5841 g N, Darmfiltrat = 0,8719 g N.

[1]) Zeitschr. f. diätetische u. physik. Therapie 1, 117—137.

4. Junger Terrier von 6,7 kg, getötet 4 Stunden nach Fütterung mit 100 g Fleisch, 25 g unkoaguliertem Ovalbumin. Mageninhalt 73 g, Darminhalt 70 g. Im Magen fester Rückstand 16,424 g mit 11,24 Proz. = 1,846 g N, im Darm 19,8597 g mit 11,65 Proz. = 2,313 g N, Magenfiltrat 200 ccm = 0,3791 g N, Darmfiltrat 250 ccm = 0,4633 g N.

5. Alter Spitz von 8,1 kg, getötet 6 Stunden nach Fütterung mit 100 g Fleisch, 15 g koaguliertem Ovalbumin. Mageninhalt 79,5 g, Darminhalt 24,0 g. Im Magen fester Rückstand 7,0838 g mit 8,044 Proz. = 0,5698 g N, im Darm 21,267 g mit 12,423 Proz. = 2,5925 g N, Magenfiltrat 200 ccm = 0,4156 g N. Darmfiltrat 250 ccm = 0,4773 g N.

Übersicht über die Resorptionsversuche.

Verdauungszeit	Futter	Stickstoffeinfuhr g	Stickstoffwiedergew. g	Resorbiert in Proz. der Aufnahme
4 Std.	200 g Fleisch, 50 g Fett	6,8	4,534	33,33
6 „	„ „	6,8	5,539	18,54
4 „	100 g Fleisch, 25 g unk. Eiereiweiß	6,69	4,071	39,16
4 „	100 g Fleisch, 25 g unk. Eiereiweiß	6,69	5,001	25,25
4 „	100 g Fleisch, 15 g koag. Ovalbumin	5,37	4,0452	24,67

Vergleichen wir die in der Tabelle wiedergegebenen Resultate mit den einzigen Versuchen, die nach gleicher Methode an Hunden ausgeführt worden sind, denen von Schmidt-Mülheim aus dem Laboratorium von Karl Ludwig, so ergibt sich für unsere Versuche eine deutliche Verzögerung der Resorption. Denn Schmidt-Mülheim fand von 200 g Pferdefleisch nach vier Stunden schon 47,4 Proz. resorbiert, nach sechs Stunden 56,2 Proz., also Werte, hinter denen die hier verzeichneten erheblich zurückbleiben. War dies Resultat für das Fett zu erwarten, so ist es auffallend für die Eiweißversuche, zumal für den Versuch mit koaguliertem Eiweiß. Ich hoffe diese Versuche bald erweitern und besonders auch den Einfluß der Kohlehydrate auf die Resorption untersuchen zu können.

Aus den hier mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß trotz der Anpassung der Sekretion der Verdauungsorgane an die verfütterte Nahrung der Endeffekt bei verschiedener Nahrung nicht innerhalb desselben Zeitraumes erreicht wird. Hierfür kommen, abgesehen von der Verdauung und Resorption, noch andere Faktoren in Betracht, von denen ich nur die Zersetzung jenseits der Darmwand

nenne. Durch Versuche mit parenteraler Zufuhr von Nahrungsstoffen hoffe ich deren Bedeutung für die hier besprochenen Vorgänge vielleicht aufklären zu können. Es bedarf vielleicht keines besonderen Hinweises, daß das Resultat der mitgeteilten Versuche auch in diätetischer Hinsicht zu neuen Überlegungen führen muß. Wenn wir nicht nur die Zersetzungskurve der einzelnen Nahrungsstoffe und ihrer Kombinationen kennen, sondern auch den hierfür maßgebenden Ablauf der einzelnen Faktoren des intermediären Stoffwechsels, so stehen uns damit neue wichtige Gesichtspunkte für die Beurteilung der Kost des gesunden und besonders des kranken Menschen zu Gebote.

XXVI.

Beitrag zur Frage der chemischen Veränderungen des Blutes nach Aderlässen.

Von Dr. **Heinrich von Hoesslin.**

Aus der zweiten medizinischen Klinik in München.

1.

In einer früheren Arbeit[1]), welche die Frage der Isotonie des Blutes nach größeren Blutentnahmen bei Kaninchen berücksichtigte, wurde bei jeder einzelnen Blutprobe eine konstante Erhöhung der Gefrierpunktserniedrigung (δ) beobachtet; diesem Sinken von δ war in den meisten Fällen eine geringe Erhöhung nach dem ersten Aderlaß vorausgegangen. Ob diese Steigerung des osmotischen Druckes auf eine Zunahme anorganischer Bestandteile, speziell des Chlornatriums, oder auf die Anwesenheit größerer Mengen von Eiweißspaltungsprodukten zurückzuführen sei, blieb unerörtert. Die letztere Annahme schien in den damaligen Versuchen keine Stütze zu finden, da zwischen der sinkenden Menge des koagulabeln Eiweißes und der zunehmenden Erniedrigung des Gefrierpunktes keine deutliche Proportionalität bestand.

In einer Reihe neuerer Versuche suchte ich nun eine Erklärung für dieses Verhalten zu finden.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt: Es wurden Kaninchen aus der Arteria femoralis in Abständen von 10 bis 20 Minuten je ungefähr 20 ccm Blut entnommen und die Proben bis zur völligen Serumabscheidung verschlossen auf Eis stehen gelassen. Die Bestimmungen berücksichtigten diesmal das Verhalten des Gefrierpunktes, des Gesamtstickstoffs und des Reststickstoffs, sowie des Chlornatriums und der Gesamtasche des Serums.

Die Bestimmung des Chlornatriums wurde meist direkt mit 5 ccm Serum vorgenommen, welches verdünnt und mit Salpetersäure versetzt, stets

[1]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 74, 577.

ziemlich klar durch das Filter ging. Kontrollversuche bei Veraschung bzw. Enteiweißung und nachfolgender Bestimmung ergaben höchstens einen Unterschied von 0,00587 bis 0,01174 g NaCl, auf 100 ccm Serum berechnet.

Die Koagulation des Eiweißes geschah mit 5 ccm Serum durch Kochen und schwaches Ansäuern mit verdünnter Essigsäure. Kontrollportionen zeigten eine höchste Differenz von 0,014 g N auf 100 ccm Serum, hatten aber meistens die gleichen Werte. Es gelingt regelmäßig, die Biuretreaktion bis auf minimale Spuren zum Verschwinden zu bringen. Ein absolutes Ausbleiben der Reaktion ist mir bei Anwendung der Schichtungsprobe fast niemals vorgekommen. Mit Essigsäure-Ferrocyankalium oder Alkohol gaben die Filtrate niemals Trübung.

In Tabelle I sind die Versuche, welche sich auf das Verhältnis von Chlornatrium und Gefrierpunktserniedrigung beziehen, wiedergegeben.

Tabelle I.

Versuch	Datum	Aderlaß	δ	NaCl Proz.	Ges.-Asche Proz.	N Proz.	Bemerkungen
I.	26. VIII. 04	1. 4h 10′	— 0,630	0,491	—	—	
		2. 4h 20′	— 0,655	0,562	—	—	Nach Unterbindung der Art. femoralis wurde das Tier wieder in den Stall gesetzt, wo es Nahrung aufnahm
		3. 4h 30′	— 0,630	—	—	—	
	27. VIII. 04	4. 11h —	— 0,605	0,562	—	—	
		5. 11h 20′	— 0,650	0,655	—	—	
II.	28. IX. 04	1. 6h 25′	—	0,495	—	—	
		2. 6h 35′	—	0,585	—	—	
		3. 6h 50′	—	0,527	—	—	
		4. 7h —	—	0,702	—	—	
IV.	4. X. 04	1. 11h 20′	—	0,644	0,34	—	
		2. 11h 35′	—	0,644	0,32	—	
		3. 11h 55′	—	0,702	0,38	—	
V.	8. X. 05	1. 4h 20′	— 0,575	0,644	0,38	1,257	
		2. 4h 40′	— 0,570	0,644	0,40	1,260	
		3. 5h —	— 0,600	0,644	0,42	0,997	Das Tier hatte inzwischen Nahrung zu sich genommen
	10. X. 05	4. 8h 55′	—	0,614	0,50	1,327	
		5. 9h 15′	— 0,685	0,614	0,50	0,955	
		6. 9h 40′	— 0,680	0,773	0,50	0,879	

Auch aus diesen Versuchen resultiert eine fast regelmäßige Erhöhung von δ; ebenso nimmt der Gehalt an Chlornatrium und Asche ziemlich konstant zu. Die ersten beiden Werte gehen jedoch nicht immer parallel, was besonders in Versuch I und V auffällt, und zwar gerade nach der eintägigen Pause zwischen zwei Blutentnahmen. Es ist also anzunehmen, daß während der Dauer der Versuche eine kochsalzreichere Flüssigkeit in die Blutbahn einströmt.

Auffallend ist die Stickstoffvermehrung zwischen der dritten und vierten Blutentnahme in Versuch V, sowie der hohe Wert von δ, während der Chlornatriumgehalt ziemlich unverändert geblieben ist; in Versuch I und auch in den früheren Versuchen hatte δ sich wieder der Norm genähert oder war sogar unter dieselbe gesunken.

Da der Gefrierpunkt des Serums nicht allein vom Chlornatriumgehalt beeinflußt wird, die Phosphate und andere anorganische Bestandteile in zu kleinen Mengen vorhanden sind, um in Betracht gezogen werden zu können, und der Aschegehalt etwas schwankt, worauf bei den kleinen verwendeten Serummengen nicht viel Gewicht zu legen ist, so könnten schließlich Eiweißabbauprodukte die Ursache des Steigens von δ sein, was den Anschauungen von Richter und Roth[1]) entspräche. Die in folgender Tabelle mitgeteilten Zahlen sprechen jedoch nicht hierfür.

Tabelle II.

Versuch	Datum	Aderlaß	Ges.-N Proz.	Rest-N Proz.	Rest-N d. Ges.-N Proz.	Bemerkungen
VII.	20. X. 05	1. $3^h 25'$	0,938	0,0875	9,328	Kleines Tier; der dritte Aderlaß wurde aus der Pfortader direkt nach dem zweiten gemacht
		2. $3^h 35'$	—	0,0525	—	
		3. $3^h 40'$	0,798	0,0613	7,676	
XI.	12. XII. 05	1. $12^h 35'$	1,063	0,101	9,486	
		2. $12^h 45'$	1,057	0,098	9,272	
		3. $1^h 10'$	0,980	0,063	6,429	$\delta = -0,62$

Demnach war auch der Gehalt an nicht koagulablem Stickstoff gesunken, und zwar in stärkerem Verhältnis als der Gesamtstickstoff (um 30,0 : 14,9 Proz. bzw. um 37,5 : 7,8 Proz.). Es kann also die Zunahme von δ nicht durch eine größere Menge von Reststickstoff bedingt werden.

Auf eine Fehlerquelle bei der Bestimmung von δ beim Serum möchte ich hier hinweisen, die kaum ganz auszuschließen ist und bisher noch wenig Beachtung gefunden hat. Benutzt man nämlich das beim Stehen des entnommenen Blutes sich zuerst ausscheidende Serum zur Bestimmung, so ergeben sich manchmal niedrigere Werte als bei dem Serum, das erst nach mehreren Stunden oder einem Tage ausgeschieden wird. Dafür spräche auch die entsprechende Zunahme des Trockenrückstandes (Moleschott[2]) die allerdings C. Schmidt als auf Fehlerquellen beruhend ansieht. Auch

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1899, S. 658; 1900, S. 138.

[2]) Vgl. C. Schmidt, Charakteristik der epid. Cholera. 1850.

ich fand den Stickstoff- und Kochsalzgehalt der ersten Portionen etwas niedriger als in den späteren.

Eine Zersetzung großer Eiweißmoleküle ist erst bei längerem Stehen in der Wärme zu erwarten; in mehreren zu diesem Zwecke angestellten Versuchsreihen hatte eine Erhöhung von δ bis zu 0,46° stattgefunden. Verdunstung war ausgeschlossen. Es war auch ziemlich gleichgültig, ob das Serum bzw. Exsudat steril aufgefangen oder bakterienhaltig war. In der Kälte geht dieser Zersetzungsprozeß naturgemäß langsamer vor sich. Es findet hierdurch die schon öfter beobachtete Konzentrationserhöhung von Nährböden durch verschiedene Bakterienarten (Zangenmeister[1]) eine einfache Erklärung.

Das umgekehrte Verhalten von Stickstoff und Kochsalz bei Blutverlusten fand schon längere Zeit Beachtung. Bereits C. Schmidt hebt hervor, daß das Blut bestrebt ist, Verluste an Eiweiß durch anorganische Bestandteile, die rascher zur Verfügung stehen, zu ersetzen und so möglichst seine Isotonie zu wahren sucht. Er berechnete als Diffusionsäquivalent von 8 bis 10 Teilen Eiweiß einen Teil Salz, indem er davon ausging, daß die Verdichtung der anorganischen Verbindungen bei der Hydratation die der organischen durchschnittlich um das 8 bis 10fache übertreffe. Bei Krankheiten mit sinkendem Eiweißgehalt des Blutes fand er dementsprechend eine Vermehrung des Chlornatriums, bei Eindickung des Blutes (Cholera) dagegen eine Verminderung desselben. Seine Angaben werden durch einen Aderlaßversuch Hamburgers[2]) am Pferde bestätigt, aus dem ersichtlich ist, „daß die durch den Eiweißverlust bedingte Verminderung des wasseranziehenden Vermögens fast gänzlich durch die vermehrte Wasseranziehung kompensiert wird, welche durch Chlornatriumzunahme des Serums hervorgerufen wird". Die anderen anorganischen Stoffe haben nur geringen Anteil daran.

Runeberg[3]) bezweifelt jedoch auf Grund von gleichlautenden Resultaten in Exsudaten von hydrämischen und nicht-hydrämischen Patienten die Richtigkeit der Auseinandersetzungen Schmidts; da er seine Schlüsse ohne genügend zahlreiche Blutuntersuchungen von den Exsudaten auf das Blut überträgt, so ist die Berechtigung seines Widerspruches nicht ohne weiteres klar.

Daß bei akuten Anämien dagegen ein Überströmen von Salzen, speziell des Chlornatriums, aus der Lymphe oder relative Vermehrung des Blutplasma und somit auch eine Salzzunahme erfolgen kann, beweist Runebergs Versuch am Kaninchen, welches auf

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 41.

[2]) Osmotischer Druck u. Ionenlehre 1904, I, 466 II, 22.

[3]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 34, 1, 266.

einen Aderlaß von 30 ccm mit einem Steigen des Kochsalzgehaltes im Blut von 0,479 Proz. auf 0,522 Proz. antwortete. Ebenso fand Limbeck[1]) in zwei Versuchen eine Vermehrung des Kochsalzes von 0,288 Proz. auf 0,345 Proz. und 0,356 Proz. auf 0,435 Proz., in einem dritten allerdings ein Gleichbleiben. Limbeck führt diese Erscheinung nicht auf Osmose zurück, sondern auf die Veränderung in der Druckdifferenz zwischen Gewebe und Arteriensystem, infolge welcher Salze rascher diffundieren als Eiweiß.

Der osmotische Druck der einzelnen Portionen bleibt nach mehreren Angaben bei dem Verblutungstode konstant (Hamburger, Limbeck); andere Autoren fanden bald ein geringes Sinken, bald ein geringes Steigen von δ. Lagen die Aderlässe zeitlich weiter voneinander, bis zu mehreren Wochen, wie bei Versuchen von Hamburger, so wurde nach dem ersten eine schwache Senkung, in den nächstfolgenden teils weiteres Sinken, teils Erhöhung konstatiert. In meinen Versuchen findet, wie schon gesagt, ein ziemlich regelmäßiges Steigen von δ statt, das in der Hauptsache jedenfalls durch die Zunahme des Kochsalzes hervorgerufen wird. Eiweißzerfallsprodukte sind sicher nicht daran beteiligt.

2.

Es lag nun der Gedanke nahe, nierenkranke Tiere zum Vergleich zu untersuchen, um zu sehen, ob bei ihnen ähnliche Verhältnisse in der Änderung des Chlornatrium- und Reststickstoffgehaltes, sowie bei δ beständen.

Die häufig hohen Werte von δ und des Reststickstoffs sind bei ihnen genügend bekannt; das Chlornatrium wurde seltener vermehrt gefunden. Da aber nicht nur im Blut, sondern auch in den Organen eine Aufspeicherung stattfinden kann, worauf besonders Ascoli in seinen Vorlesungen über Urämie hinweist, und ferner manchmal eine Anhäufung von Kochsalz in Organen und Muskeln nachgewiesen wurde [Chajes[2]), Inglfinger[3])], so war die Möglichkeit gegeben, daß infolge von Aderlässen unverhältnismäßig mehr Chlornatrium oder nicht koagulabler Stickstoff in die Blutbahn ausgeschwemmt würden als bei dem gesunden Tiere.

Zu diesem Zwecke wurden Kaninchen mittels Urannitrat, das zu 0,05 bis 0,1 g an 3 bis 4 Tagen subkutan eingespritzt wurde, nephritisch gemacht

[1]) Grundriß d. klin. Pathol. d. Blutes 1892, S. 102.
[2]) Festschr. f. Senator 1904, S. 135.
[3]) Ann. d. städt. Krankenhauses München, l. d. I., 1905.

und das Entstehen von Ödemen bzw. Transsudaten durch Infusion von etwa 10 g Kochsalz in Lösung per os begünstigt. Am Tage des Versuches waren die Tiere mehr oder weniger komatös; es bestand meist ein nicht sehr ausgesprochenes Hautödem, dagegen sehr starker, rasch gerinnender Ascites sowie Ergüsse in Pleura- und Pericardialhöhle. Die Nieren wiesen starke parenchymatöse Veränderungen auf. Urin war in den letzten Tagen nicht mehr entleert worden.

In nachstehender Tabelle sind die Versuche wiedergegeben.

Tabelle III.

Versuch	Datum	Aderlaß	δ	NaCl Proz.	Ges.-N Proz.	Rest-N Proz.	Rest-N d. Ges.-N Proz.	Bemerkungen
VI.	17. X. 05	1. 6^h 50′	— 1,185	1,170	0,770	0,201	26,14	Das Serum sämtlicher nephritischen Tiere zeigte getrübtes, milchiges Aussehen
		2. 7^h —	— 1,160	1,170	0,749	0,245	32.71	
		3. 7^h 10′	— 1,230	1,230	0,707	—	—	
		4. 7^h 20′	— 1,140	1,229	0,670	0,221	32,91	
		5. 7^h 25′	—	1,287	0,637	—	—	
VIII.	28. X. 05	1. 5^h 20′	— 0,715	0,936	0,959	0,182	18,98	
		2. 5^h 30′	—	0,936	0,861	0,210	24,39	
		3. 5^h 45′	—	0,995	0,875	0,238	27,20	Letzte Blutentnahme aus der Pfortader
		4. 5^h 50′	—	0.995	0,840	0,224	26,67	
IX.	4. XII. 05	1. 4^h —	— 0,680	—	1,134	0,245	21,61	
		2. 4^h 10′	— 0,670	--	1,120	0,294	26,25	
		3. 4^h 25′	— 0,680	—	1,008	0,238	23,61	
X.	5. XII. 05	1. 3^h 55′	— 0,720	0,398	1,050	0,294	28,00	Das Tier war dem Exitus nahe
		2. 4^h 10′	—	—	1,008	0,294	29,17	
		3. 4^h 25′	— 0,870	0,468	1,008	0,301	29,86	
		4. 4^h 40′	— 0,905	—	0,938	0.273	29,10	
		5. 5^h —	—	—	0,896	0,306	34,15	

Es stellt sich also heraus, daß der osmotische Druck, wie es häufig auch beim Menschen vorkommt, bei den nephritischen Tieren gesteigert ist, und zwar einmal ganz exzessiv (Versuch VI), die anderen Male in geringerem Grade. Die Schwankungen bei den einzelnen Blutentnahmen sind meist etwas stärker als unter normalen Verhältnissen, nur bei Versuch IX halten sie sich in den gleichen Grenzen. Es ist nicht unmöglich, daß zu dieser Erhöhung von δ das Übertreten von Ödem-, Pleura oder Ascitesflüssigkeit beigetragen hat, da die Werte von δ, sowie auch von Chlornatrium und Reststickstoff in letzteren fast die gleichen oder sogar etwas höher waren als im Serum, was bei Gelegenheit anderer Versuche mehrmals festgestellt werden konnte. Speziell war der prozentuale

Gehalt an Reststickstoff im Verhältnis zum Gesamtstickstoff enorm hoch und betrug bis zu 70,6 Proz.

Der Chlornatriumgehalt ist ferner in zwei Versuchen (VI und VIII) abnorm hoch, in dem dritten wieder normal, obwohl auch hier hohe Werte für δ erreicht werden. Seine Steigerung bei den einzelnen Aderlässen ist auch nicht größer als bei den gesunden Tieren, es findet demnach keine weitere Ausschwemmung von Kochsalz aus den Geweben oder Organen statt, auch falls diese mehr davon enthielten als normal. Durch eine folgende Durchspülung mit Wasser wäre dies vielleicht zu erreichen gewesen. Die Vermehrung des Chlornatriums im Gesamtblut kann nur 1 bis 2 g betragen: da aber bedeutend mehr den Tieren eingegeben wurde und nach den Kochsalzinfusionen kein Urin mehr entleert worden war, muß eine Historetention stattgefunden haben. Auch die Exsudatmengen waren immer noch zu gering, um den ganzen Rest des Chlornatriums enthalten zu können.

In sämtlichen Versuchen fand sich dagegen die Menge des Reststickstoffs bedeutend gesteigert, wobei ganz enorme Werte erreicht wurden, wie sie beim Menschen kaum beobachtet worden sind. Eine Steigerung war bei den nierenkranken Tieren zu erwarten gewesen; gegenüber dem menschlichen Serum finden sich aber auch schon bei gesunden Tieren Werte von 0,05 bis 0,105 Proz. des Serums. Im Gegensatz zu den normalen Tieren besteht nun in den einzelnen Blutentnahmen die Neigung zu einer geringen Vermehrung des Reststickstoffs, weniger ausgesprochen der absoluten als der relativen Mengen, im Verhältnis zum Gesamtstickstoff des Serums[1]). Es könnte also scheinen, als ob bei dem nephritischen Tiere mehr Stoffe bzw. Zerfallsprodukte für die Ausschwemmung zur Verfügung ständen als bei dem normalen und sie rascher und leichter in das Blut überträten. Ob diese Steigerung der Reststickstoffausfuhr auf eine Aufspeicherung von derartigen Produkten in den Organen schließen läßt, mag dahingestellt bleiben. Mehrere Bestimmungen desselben in der Leber von urämischen und normalen Tieren gaben bis jetzt wenigstens keinen Anhalt dafür.

Kurz zusammengefaßt sind also die Resultate folgende:

1. Entnimmt man Kaninchen in kürzeren Zwischenräumen relativ große Mengen Blut, so findet sich in dem Serum von ge-

[1]) Soetbeer erwähnte auf dem Kongreß für innere Medizin 1906, daß er zu gleichen Ergebnissen gekommen sei; meine Arbeit war damals schon abgeschlossen.

sunden Tieren bei den einzelnen Aderlässen neben einer Abnahme des Gesamtstickstoffs bzw. Eiweißgehaltes ein ziemlich gleichmäßiges Ansteigen des Chlornatriumgehaltes und von δ, dagegen eine relative und absolute Abnahme des Reststickstoffs.

2. Im Serum von nierenkranken Tieren findet sich in manchen Fällen eine Zunahme des Chlornatriums, stets eine Erhöhung von δ und des Reststickstoffs; bei jeder folgenden Blutentnahme steigt auch hier der Gehalt an Chlornatrium; δ verhält sich unregelmäßiger als bei dem normalen Tiere; der Gesamtstickstoff nimmt auch hier ab, der Reststickstoff dagegen relativ und, weniger ausgesprochen, auch absolut zu.

XXVII.

Über das Nukleoproteïd des Blutserums.

Von Dr. **G. Liebermeister** (Köln).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Bei seinen eingehenden Untersuchungen über das Fibrinferment stieß Pekelharing[1]) im Rinderblutserum auf geringe Mengen eines Nukleoproteïds, das er — mit welchem Rechte, soll hier nicht erörtert werden — für das Zymogen des Fibrinferments ansprach. Es schied sich neben Globulin bei Verdünnen des Serums mit Wasser und Zusatz von Essigsäure aus. Durch vorsichtigen weiteren Zusatz von Essigsäure ging das Globulin wieder in Lösung, das zurückbleibende Nukleoproteïd konnte dann leicht durch eine Spur Alkali in Lösung gebracht werden. Bei Pepsinverdauung spaltete es Nukleïn ab.

Huiskamp[2]) reinigte das durch Verdünnen und Essigsäurezusatz gefällte Nukleoproteïd durch wiederholtes Lösen in möglichst wenig Ammoniak und Fällen mit Calciumchlorid. Die mit Alkohol und Äther ausgewaschene Substanz enthielt 1,853 Proz. Asche und 0,639 Proz. Ca. Der Phosphorgehalt schien gering zu sein, und Huiskamp hält eine Verunreinigung seines Produktes mit Globulin nicht für ganz ausgeschlossen.

Allem Anscheine nach haben Freund und Joachim[3]) den gleichen Körper bei Untersuchung der Eiweißstoffe des Blutserums von Mensch, Pferd und Rind erhalten. Er fand sich in kleiner Menge in der durch Dialyse ausfallenden Euglobulinfraktion und ließ sich vom wasserunlöslichen Euglobulin durch seine Unlöslich-

---

[1]) Zentralbl. f. Physiol. 9, 102.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 191.
[3]) Physiol. Zentr. 1902, S. 397; Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 407.

keit in 0,6 proz. Chlornatriumlösung trennen. Er löste sich leicht in 0,25 proz. Sodalösung und wurde durch Drittelsättigung mit Ammonsulfat, Halbsättigung mit Kaliumacetat, Sättigung mit Kochsalz und Magnesiumsulfat vollständig ausgefällt. Bei Neutralisation der alkalischen Lösung mit Essigsäure oder Kohlensäure fiel er aus, ging aber im Überschuß der Säure nicht wieder in Lösung. Die Fällungsgrenze gegenüber gesättigter Ammonsulfatlösung lag bei 36 Proz. Sättigung. Nach längerer Einwirkung von Pepsinsalzsäure bei Bruttemperatur schied sich ein flockiger Niederschlag ab, der in verdünnter Natronlauge löslich war, spärlichen Phosphorgehalt aufwies und nach Spaltung mit kochender 10 proz. Salzsäure wenigstens in einem Teil der Fälle mit ammoniakalischer Silberlösung einen flockigen, in Ammoniak unlöslichen Niederschlag gab. Aus zwei Globulinfraktionen dargestellte Proben des Körpers zeigten so übereinstimmende Eigenschaften, daß Freund und Joachim zu der Annahme neigen, daß im Blutserum nur ein einziger Nukleïnkörper — sie bezeichnen ihn als „Nukleoglobulin" — vorkommt.

Wie aus allen einschlägigen Angaben hervorgeht und auch Hammarsten[1]) betont, ist die Menge dieses Nukleïnkörpers für gewöhnlich überaus klein. Dem entsprechend fehlen genauere Angaben über seine Zusammensetzung und sein sonstiges chemisches Verhalten.

Pascucci hat dann im hiesigen Laboratorium zuerst gezeigt, daß es auf dem unten von mir beschriebenen Wege möglich ist, etwas größere Mengen des fraglichen Nukleoproteïds darzustellen, und ich habe im Anschluß daran versucht, die chemische Natur desselben besser zu definieren.

Bei der Darstellung ging ich folgendermaßen vor:

Je 1 Liter Pferdeblutserum wurde mit Wasser auf 20 Liter verdünnt und in die Lösung Kohlensäure eingeleitet. Nachdem sich die entstandene Trübung abgesetzt hatte, wurde das darüberstehende verdünnte Serum abgehebert und der aus Euglobulin und dem Nukleoproteïd bestehende Niederschlag abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in den flachen Zentrifugengläsern mit etwa dem fünffachen Volumen 1 proz. Chlornatriumlösung vorsichtig übergossen und einige Stunden stehen gelassen. Nach etwa 6 Stunden war der vorher weiße Niederschlag verschwunden, und nach vorsichtigem Abgießen der Globulin—Kochsalzlösung blieb am Boden der Zentrifugengläser ein glasheller, schleimiger, fadenziehender Körper zurück, der

[1]) Asher-Spiro, Ergebnisse I, 9, 330.

sich in 1 proz. Kochsalzlösung nach Zusatz von einer Spur Natriumcarbonat löste. Aus der sodahaltigen Kochsalzlösung wurde der Körper mit wenig verdünnter Essigsäure ausgefällt, nach einigem Stehen filtriert, der Niederschlag mit Alkohol koaguliert, mit heißem Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet.

Die vereinigte, graubräunlich aussehende, getrocknete Substanz wurde in der Reibschale zu Pulver verrieben, im Soxhletapparat zuerst mit Alkohol etwa 12 Stunden lang extrahiert, sodann mit Äther so lange behandelt, bis das Ätherextrakt keinen Phosphorgehalt mehr aufwies. Zuletzt wurde noch etwa 10 Stunden mit Chloroform extrahiert. Die Ätherextraktion mußte immer auf mehrere Tage ausgedehnt werden, da sich noch sehr lange im Extrakt Phosphor nachweisen ließ. Nach der Chloroformextraktion wurde der Körper nochmals bei 100° getrocknet.

Ich erhielt aus etwas mehr als 15 Liter Serum beinahe 2,5 g Substanz (Präparat a). Unter pathologischen Verhältnissen kann der Körper anscheinend erheblich vermehrt sein. Während er im normalen Pferdeblutserum nur zu etwa 0,15 bis 0,2 pro Tausend enthalten ist, erhielt ich von einem wegen einer schweren septischen Eiterung geschlachteten Pferde aus 3 Liter Blutserum mehr als 6 g der Substanz. Dieses Produkt wurde für sich untersucht (Präparat b). Präparat a) und b) stimmten übrigens in ihrem ganzen chemischen und physikalischen Verhalten überein. Auch die Analysenzahlen (s. unten) weisen keine wesentlichen Unterschiede auf.

Reaktionen: Das Serumnukleoproteïd ist in frischem Zustande, ehe es durch Alkohol koaguliert wird, löslich in Sodalösung und in Natronlauge. In 1 proz. Chlornatriumlösung löst es sich nicht, bei höherer Chlornatriumkonzentration quillt es zu einer ziemlich klaren fadenziehenden Scheinlösung auf, die beim Versuch, sie zu filtrieren, das Filter sofort vollständig verstopft. In reinem Wasser löst sich das Nukleoproteïd nicht, ebenso nicht in Ammonsulfatlösung oder in mit Kohlensäure gesättigter Chlornatriumlösung. Essigsäure fällt den Körper aus, löst ihn aber in großem Überschusse wieder, jedoch bedeutend schwerer als das Euglobulin (vgl. Pekelharing, l. c.).

Aus schwach alkalischer Lösung wird das Nukleoproteïd durch Ammonsulfat bei einem Konzentrationsgrad von 38 bis 44 Proz. Sättigung vollständig ausgesalzen. Durch Alkohol wird das Nukleoproteïd koaguliert, ebenso durch Hitze nach Ansäuern. Mit Ferrocyankalium und Essigsäure fällt es aus.

Die Millonsche Probe war positiv, ebenso die Xanthoproteïnreaktion; dagegen fiel die Adamkiewiczsche und die Hopkinssche Probe negativ aus. Der Körper gab deutliche

Biuretreaktion, stärker, wenn er vorher durch Säure aufgespalten wurde.

Die Ihle-Molischsche Probe war positiv; sehr stark positiv fiel sie aus, wenn der Körper vorher eine Zeitlang mit Salzsäure gekocht war. Jedoch gelang es nicht, nach dem Vorgange von Fr. Müller eine reduzierende Substanz abzuspalten; möglicherweise war die für diesen Versuch zur Verfügung stehende Menge Substanz (weniger als $^1/_2$ g) zu gering.

Zum Nachweis von Purinkörpern wurde das Nukleoproteïd etwa 4 Stunden mit 10proz. Salzsäure gekocht; als die Lösung der Spaltungsprodukte noch Biuret- und Xanthoproteïnreaktion gab, aber nicht mehr durch Ferrocyankalium und Essigsäure oder durch Salpetersäure gefällt wurde, auch durch Ammonsulfat sich nicht mehr aussalzen ließ, gab sie mit ammoniakalischer Silberlösung einen Niederschlag. Der Niederschlag wurde in Salpetersäure gelöst, das Silber durch Schwefelwasserstoff ausgefällt; das davon gewonnene Filtrat gab keine Murexidprobe, auch keine Weidelsche Probe, dagegen beim Eindampfen Gelbfärbung, die auf Alkalizusatz in Braungelb umschlug.

Mit alkalischer Bleioxydlösung abspaltbarer Schwefel ließ sich nicht nachweisen. Eisen war mit der Ferrocyankaliumprobe nur in Spuren nachweisbar.

Die Analysen ergaben nachstehende Werte:

Präparat a) 0,3273 g der über P_2O_5 getrockneten Substanz gaben 0,6199 g CO_2, 0,2134 g H_2O und 0,0011 g Rückstand.

0,2722 g der über P_2O_5 getrockneten Substanz gaben 32,7 ccm N bei 16° C und 761 mm Druck.

0,5305 g der bei 100° getrockneten Substanz gaben 0,0015 g $Mg_2P_2O_7$.

Präparat b) 0,1958 g der über P_2O_5 getrockneten Substanz gaben 0,3737 g CO_2, 0,1277 g H_2O und 0,0007 g Rückstand.

0,1913 g der über P_2O_5 getrockneten Substanz gaben 23,4 ccm N bei 15° C und 760,5 mm Druck.

0,6743 g der bei 100° getrockneten Substanz gaben 0,0021 g $Mg_2P_2O_7$.

Somit in Prozenten:

	C	H	N	P	Asche
Präparat a)	51,65	7,24	13,88	0,079	0,33
„ b)	52,05	7,24	14,18	0,087	0,35

Die Substanz enthält etwa 1 Proz. S.

Streng genommen sind die Werte für P, weil an einer bei 100° getrockneten Substanz gewonnen, mit den übrigen Werten, die von einer bei Zimmertemperatur über P_2O_5 getrockneten Substanz stammen, nicht direkt vergleichbar. Doch fällt die etwa vorhandene geringe Abweichung im Trocknungsgrade der Präparate bei der Niedrigkeit der P-Werte überhaupt nicht ins Gewicht.

Der sehr geringe Gehalt an Phosphor läßt die Frage berechtigt erscheinen, ob es sich nicht dabei nur um beigemengte Reste von Lecithin oder anderen Phosphatiden handelt, d. h. ob hier überhaupt ein Nukleoproteïd vorliegt.

Die Tatsache, daß es nicht gelingt, bei noch so sorgfältiger Extraktion den Phosphor zum Verschwinden zu bringen, spricht für die Nukleïnnatur der Substanz. Wichtiger ist der bereits von Pekelharing, von Freund und Joachim und auch von mir geführte Nachweis, daß die Substanz Nukleïn- bzw. Purinbasen (richtiger: durch ammoniakalische Ag-Lösung fällbare Stoffe), wenngleich nur in geringer Menge, abspaltet. Dazu kommt die reaktionelle Ähnlichkeit mit Nukleïnkörpern, wie sie in der visciden Beschaffenheit und schlechten Filtrierbarkeit der Lösungen, sowie der relativen Unlöslichkeit in überschüssiger verdünnter Essigsäure gegeben ist.

Bei dem so niedrigen P-Gehalt ergibt sich freilich die Notwendigkeit — falls die Substanz einheitlich ist —, ein überaus großes Molekulargewicht anzunehmen, und man muß daher um so mehr daran denken, daß es sich nur um ein Gemenge von unter Wasser unlöslich gewordenem Euglobulin mit einem noch nicht isolierten einfacheren Nukleoproteïd handeln könnte. Gegen diese Vorstellung spricht der Umstand, daß das Euglobulin nachweisbar seine Löslichkeit in Kochsalzlösung nicht so rasch verliert, ferner die Übereinstimmung der beiden dargestellten Präparate. Doch ist da vorläufig eine sichere Entscheidung nicht zu treffen.

Die konstante Anwesenheit eines Nukleoproteïdes im Blutserum kann sehr verschiedene Bedeutung beanspruchen. Sie kann mit Bildung und Abbau nukleïnhaltiger geformter Elemente in Beziehung gebracht, kann aber auch als Hinweis auf einen durch die Blutbahn stattfindenden Transport von Nukleoproteïden aufgefaßt werden.

Von den sich so ergebenden mannigfachen Möglichkeiten wäre namentlich eine Beziehung zur Kaseïnbildung von Interesse gewesen. Die mit Lab angestellten Versuche fielen negativ aus. Auch sprechen die ermittelten Daten gegen eine Beziehung unseres Körpers zum Kaseïn. Der geringe Phosphorgehalt, das Vorhandensein von Purinkörpern und einer Kohlehydratgruppe schließen den Übergang des Nukleoproteïdes in Kaseïn, wenigstens ohne vorhergehende tiefgehende Spaltung schlechtweg aus. Auch die Stickstoffverteilung im Nukleoproteïd entspricht nicht jener im Kaseïn. So lieferte das Nukleoproteïd in meiner Bestimmung (ausgeführt nach Hausmann und Gümbel[1]) 1,17 Proz. Amid-N, während Kaseïn über 1,8 Proz. Amid-N ergibt.

[1]) Vgl. diese Beiträge 5, 297.

Zur Zeit dürfte die Vermutung am nächsten liegen, daß das Nukleoproteïd des Blutserums mit dem Schicksal der Leukocyten des Blutes in Beziehung steht, nicht bloß weil die Leukocyten als nukleïnhaltige und wenig widerstandsfähige Blutbestandteile naturgemäß zunächst in Betracht kommen, sondern auch wegen der von mir zufällig gefundenen enormen Vermehrung in einem Falle von Sepsis mit Eiterung. Es dürfte der Mühe lohnen, das Verhalten des Nukleoproteïds unter pathologischen Bedingungen, namentlich bei Erkrankungen, die mit Veränderungen der Blutzusammensetzung einhergehen, eingehender zu verfolgen.

XXVIII.

Über Nachweis und physiologisches Verhalten der Glyoxylsäure.

Von Dr. **Ernst Schloss.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

1.

Die Untersuchungen Eppingers[1]) über das Verhalten der Glyoxylsäure im Tierkörper, namentlich die Auffindung einer Reaktion, die es ermöglicht, überaus kleine Mengen davon direkt qualitativ nachzuweisen, haben in jüngster Zeit die Aufmerksamkeit auf das Vorkommen dieses verbreiteten Oxydationsproduktes im Organismus und im Harn gelenkt.

Eppinger hat sich bei seinen Versuchen zum Nachweis der Glyoxylsäure mehrerer qualitativer Reaktionen — der Überführung des Calciumglyoxylats in Oxalat, der Duppa-Perkinschen Anilidreaktion, der Elbersschen Phenylhydrazinprobe, namentlich aber der umgekehrten Adamkiewicz-Hopkinsschen Indolreaktion bedient. In wichtigen Fällen erhitzte er die Glyoxylsäure mit Harnstoff und Salzsäure und identifizierte das entstandene Allantoin durch Stickstoffbestimmung. Für klinische und experimentelle Zwecke kann jedoch dieses umständliche Verfahren nur ausnahmsweise in Anwendung kommen, und man ist wenigstens für die erste Orientierung auf die qualitativen Reaktionen angewiesen, unter denen die Indolprobe durch Empfindlichkeit und Bequemlichkeit die anderen überragt. Doch rät Eppinger zur Vorsicht bei Beurteilung des positiven Ausfalles. Er sah nur solche Proben für positiv an, wo der beim Schichten der indolversetzten Probe mit konzentrierter Schwefelsäure auftretende charakteristische rote Ring beständig war und sich allmählich über die ganze überstehende Flüssigkeit

---

[1]) Diese Beiträge 6, 432.

ausbreitete. Überdies untersuchte er in gleicher Weise das Harndestillat, wo sich der störende Einfluß nicht flüchtiger Stoffe (z. B. der Harnfarbstoffe) nicht geltend machen konnte.

Wie sich nachträglich herausstellte, war damit eine wichtige Fehlerquelle nicht ganz ausgeschlossen. Sie wurde durch Inada[1]) klargestellt. Er fand, daß Kaninchenharn, auf den sich Eppingers Angaben vielfach bezogen, überraschend häufig, viel häufiger als man nach den einschlägigen Angaben erwarten konnte, Nitrite enthielt. Die Nitrosoindolreaktion hat nun in der Farbe große Ähnlichkeit mit der Glyoxylreaktion, bietet aber doch so charakteristische Abweichungen von ihr dar, daß es Inada möglich war, eine Methodik des Glyoxylsäurenachweises anzugeben, die es einigermaßen gestattet, die beiden Substanzen, wenn sie getrennt auftreten, zu unterscheiden, mit der es aber noch nicht möglich ist, bei ihrem gleichzeitigen Vorhandensein einen exakten Nachweis zu liefern.

Aus diesen Ermittelungen Inadas ging natürlich die Notwendigkeit hervor, zu untersuchen, ob die Resultate Eppingers von dieser Fehlerquelle beeinflußt waren. Mit Rücksicht auf die klinische Verwendbarkeit habe ich mich zunächst bemüht, der so charakteristischen Indolprobe eine Form zu geben, daß sie auch im Harn zu zuverlässigen Resultaten führt.

Der Ausführung im Harn stellen sich zwei Hauptschwierigkeiten entgegen, einmal das öftere Vorkommen der Nitrite, das, wie erwähnt, zu Täuschungen Veranlassung geben kann, sodann das Vorhandensein einer Substanz, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure an der Berührungszone intensiv dunkel färbt, und hierdurch das Auftreten des charakteristischen roten Ringes teilweise oder völlig unkenntlich macht. Um dieser Schwierigkeiten Herr zu werden, hatte Eppinger und auch noch Inada die Destillation des Harns mit Phosphorsäure empfohlen. Doch hatten sie schon bemerkt, daß der Nachweis dadurch an Empfindlichkeit einbüßt. Die Nachprüfung zeigte mir nun, daß die salpetrige Säure aus einer Nitritlösung ziemlich leicht übergeht, dagegen die Glyoxylsäure recht schwer, so daß selbst eine 1 proz. Lösung im Destillat nur schwache Reaktionen gibt. Die danach naheliegende Vermutung, daß die von Eppinger empfohlene Destillation die Gefahr einer Verwechselung mit salpetriger Säure geradezu steigert, trifft allerdings nicht zu, da, wie unten gezeigt wird, salpetrige Säure

[1]) Diese Beiträge 7, 473.

im Harn durch Zusatz von Mineralsäure rasch zerstört wird. Leider gilt aber ähnliches auch für die Glyoxylsäure; während sie in reiner wässeriger Lösung gegen Kochen recht beständig ist, wird sie im Harn durch Erhitzen leicht zerstört. Jedenfalls verliert der Nachweis durch die Destillation außerordentlich an Empfindlichkeit. Um also die beiden Fehlerquellen auszuschalten, mußte nach anderen Modifikationen der Methode gesucht werden.

Was zunächst die Nitrite betrifft, so läßt sich ja nach Inada ihr Auftreten im Harn bei Versuchskaninchen durch reine Haferfütterung beschränken. In der Tat gelingt dies meist, doch nicht immer. Auch ist es nach meinen Erfahrungen sicher, daß die Nitrite sehr häufig erst beim Stehen durch Zersetzung des Harns entstehen. Wenigstens habe ich wiederholt gesehen, daß Harn, der frisch ganz frei von Nitriten war, nach einigen Stunden reichlich davon enthielt. (In ganz frischem Harn habe ich überhaupt nie Nitrite gefunden, doch geht aus den Versuchen Inadas mit Bestimmtheit das Vorhandensein einer direkten Nitritausscheidung hervor.) Um nun jede Täuschung zu vermeiden, ist es das rationellste, in jedem Falle das Vorhandensein von Nitriten anzunehmen, sie aber vor Anstellung der Indolreaktion zu beseitigen.

Es war mir aufgefallen, daß, wenn man zu einem Harn, dem man künstlich Nitrite zugesetzt hatte, zuerst verdünnte Schwefelsäure und dann erst Indol zusetzte, die Nitritreaktion viel schwächer auftrat, als wenn man die umgekehrte Reihenfolge einhielt; je länger man nun nach der Schwefelsäurezugabe mit dem Indolzusatz wartete, um so geringer war die Rotfärbung. Dies wurde nun systematisch durchprobiert und zwar am wenig konzentrierten Hundeharn, bei dem sich das zweite störende Moment, die Schwärzung durch konzentrierte Schwefelsäure, nicht geltend machte. Dem Harn wurden bekannte geringe Mengen Kaliumnitrit und Glyoxylsäure zugesetzt und es wurde ermittelt, bei welcher Behandlungsweise die Nitrite am sichersten zu entfernen waren, ohne die Glyoxylsäurereaktion zu beeinträchtigen.

Als geeignetstes Verfahren stellte sich folgendes heraus: Man versetzt den Harn mit etwa 1 bis 2 ccm verdünnter Schwefelsäure (10 Proz.), schüttelt gut durch, läßt ihn nun etwa 10 Minuten, am besten etwas erwärmt, stehen und stellt dann die gewöhnliche Indolreaktion an.

Bei dem Zusatz von verdünnter Schwefelsäure entwickelt nitrithaltiger Harn reichlich Stickstoff. Welcher Bestandteil des Harns vorwiegend das Verschwinden der Nitrite bedingt, ist nicht aufgeklärt. Harnstoff ist es jedenfalls nicht, wie zunächst anzunehmen war, da zweiprozentige Harnstofflösung mit wenig Nitrit und verdünnter Schwefelsäure versetzt die Nitrosoindolreaktion unverändert gab.

Die Beseitigung der Nitrite auf diesem Wege gelingt aber nicht nur im Harn. Besonders wertvolle Dienste leistete mir das Verfahren bei den weiter unten zu schildernden Oxydationsversuchen.

Nun gibt es scheinbar noch einen ganz einfachen Weg, jeder Verwechselung von Glyoxylsäure mit Nitriten vorzubeugen, wenn man nämlich zu der Reaktion statt Indol Skatol verwendet. Schon Eppinger hat über die Verwendbarkeit der Indolderivate statt der Muttersubstanz Untersuchungen angestellt. Das Methylketol erwies sich dabei als ungeeignet, was auch meine Versuche bestätigten. Dagegen hielt er das Skatol für brauchbar, neben dem Indol zur Reaktion zugezogen zu werden, legte aber stets auf die Indolprobe das Hauptgewicht. Inada zeigte nun, daß Skatol mit Nitrit keine Rotfärbung gibt, wie es dies mit Glyoxylsäure tut. Ein genaues Studium der Verhältnisse gab mir nun die Sicherheit, daß Skatol in jedem Falle, wo Glyoxylsäure vorhanden ist, reagiert; es hat sogar den Vorteil, bei nicht klaren oder gefärbten Lösungen durch sein tieferes Rot mehr durchzudringen als Indol. Trotzdem halte ich Skatol nicht für geeignet, das Indol zu ersetzen, sondern möchte es nur immer neben ihm angewendet wissen, und zwar aus folgenden Gründen:

Zunächst scheint Skatol nicht so spezifisch zu reagieren wie Indol, da es manchmal stark positive Reaktionen gibt, wo die Indolprobe absolut negativ bleibt; dann ist die Farbennuance der letzteren Probe konstant, während die Skatolreaktion recht verschiedene Farbentöne annehmen kann.

Manchmal tritt nur ein einfacher roter Ring wie beim Indol auf, ein andermal ist dieser Ring tief rot, dann ist sehr oft ein grüner Ring dabei, bald über bald unter dem roten, öfters tritt eine ganze Farbenskala auf, so daß hieraus für die Beurteilung eine gewisse Unsicherheit resultiert. Schließlich ist die Skatolreaktion, zumal in nicht ganz klaren Lösungen, sehr unbeständig, indem die anfangs rote Farbe ziemlich bald in ein schmutziges Blaugrau übergeht, während sich die Indolreaktion je länger um so schöner zu entwickeln pflegt.

Nur in wenigen Fällen wird Skatol als Nachweismittel eine größere Bedeutung haben; so in Fällen, wo Indol nur eine zweifelhafte Rotfärbung gibt, während Skatol noch einen deutlichen Ring zeigt. Ferner kann man bei klaren Lösungen oder hellem Harn vor Anstellung weiterer Prozeduren schnell durch eine Skatolprobe Aufschluß gewinnen, ob die weitere Verarbeitung erfolgen soll. Auch wo die Beseitigung der Nitrite nicht prompt gelingt, kann man sie zur Anwendung bringen.

Die Beseitigung des zweiten störenden Umstandes gelang nicht so einfach. Über die Natur der im Harn oft vorkommenden Substanz, die mit konzentrierter Schwefelsäure an der Berührungsfläche einen dunkeln, fast schwarzen Ring bildet und beim

Schütteln den ganzen Harn intensiv braunrot bis schwarz färbt, ist nichts sicheres bekannt.

Man bringt sie meist mit den Harnfarbstoffen in Beziehung. Ihr Auftreten scheint mit der Art der Nahrung zusammen zu hängen. So ist diese Schwarzfärbung mit Schwefelsäure bei Kaninchen nach Haferfütterung weitaus am stärksten, weniger stark nach Kohlfütterung. (Aufgefallen ist mir, daß sie bei Alkoholzufuhr fehlte.) Dem Harn des Fleischfressers (Hund) scheint der betreffende Körper abzugehen; im Harn von Menschen mit gemischter Kost ist er ziemlich reichlich vorhanden.

Die Anwesenheit dieses Körpers macht den direkten Nachweis der Glyoxylsäure in vielen Harnen unsicher oder unmöglich. So entzogen sich selbst größere Mengen Glyoxylsäure, denen ich Kaninchenharn zugesetzt hatte, dem direkten Nachweis. Es wurde daher versucht, diesen Körper völlig zu entfernen. Die gewöhnlichen Fällungsmittel hatten alle den Nachteil, daß sie die zugesetzte Glyoxylsäure mit niederrissen. Mehr Erfolg hatte der Versuch mit Klär- und Entfärbungsmethoden zum Ziele zu kommen. Am brauchbarsten erwies sich für unseren Zweck die Tierkohle. Sie vermag, wie genauere Vergleichsversuche ergaben, in der Regel den Harn, ohne den Gehalt an Glyoxylsäure merklich zu verändern, schon in der Kälte so vollständig von dem störenden Körper zu befreien, daß er bei Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure völlig farblos bleibt.

Die Tierkohle muß ganz feinpulverig sein, um sich mit dem Harn innig zu vermischen. Die Zeit, die zur Beseitigung des Körpers erforderlich war, wurde bei der wechselnden Konzentration des Harns verschieden gefunden; doch genügte in den meisten Fällen ein halbstündiges Behandeln mit Tierkohle.

Auf Grund des Gesagten gestaltet sich die Ausführung der Glyoxylsäurereaktion im Harn folgendermaßen:

Man hält sich Lösungen von je 0,2 g Indol und Skatol in 100 ccm Wasser vorrätig. Ist der Harn wenig konzentriert bzw. genügend hell, so kann man eine direkte Prüfung mit Skatol vornehmen. Bildet sich an der Berührungszone gar kein Ring, so ist die Anwesenheit von Glyoxylsäure ohne weiteres auszuschließen. Bildet sich jedoch ein roter, oder wie wohl meist, ein brauner Ring, so muß die genauere Prüfung wie folgt vorgenommen werden.

Man verrührt etwa 20 ccm des Harns mit ungefähr der Hälfte des Volums Tierkohle und läßt das Ganze mindestens eine halbe Stunde stehen, dann filtriert man ab und fügt zu einer Probe des nunmehr farblosen Filtrats 1 bis 2 ccm verdünnter Schwefelsäure, schüttelt gut durch und läßt ungefähr 10 Minuten, am besten

im Wasserbade bei 50°, stehen. Inzwischen stellt man mit einer anderen Probe die Skatolreaktion an, indem man etwa 1 ccm der Skatollösung zusetzt und dann vorsichtig mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet. Auf gleiche Weise wird nun die mit Schwefelsäure behandelte Probe mittels Indollösung geprüft. Tritt in beiden Eprouvetten nach höchstens zwei bis drei Minuten ein scharf konturierter roter Ring an der Berührungszone auf, so weist dies auf die Anwesenheit von Glyoxylsäure hin. Positive Skatolreaktion allein ist nicht beweisend, ebensowenig das Auftreten einer sehr schwachen Rotfärbung bei der Indolprobe, falls die Skatolprobe negativ bleibt.

Die Indolprobe ist in dieser modifizierten Form, ähnlich wie nach Eppinger in wässeriger Lösung, sehr empfindlich. Es gelingt, damit noch 0,00001 g Glyoxylsäure in 1 ccm Harn nachzuweisen. Ob sie sich für die Untersuchung von Menschenharn in weiterem Umfange eignet, sollen weitere Versuche zeigen.

2.

Mit Hilfe dieser verbesserten Methode wurde nun eine Anzahl von Substanzen, die ihrer Konstitution nach dazu fähig schienen, durch vorsichtige Oxydation bzw. Spaltung mit Alkalien auf Bildung von Glyoxylsäure untersucht. Als Oxydationsmittel diente in erster Reihe Permanganat (Kalium- und Calciumsalz), dann Wasserstoffsuperoxyd und Chromtrioxyd. Beim Permanganat wurde nur in neutraler Lösung oxydiert, ebenso wurde von den zu prüfenden Säuren stets das Natriumsalz genommen. Da der Zusatz der theoretisch berechneten Menge des Oxydationsmittels öfters nicht zum Ziele führte, wurde das Verfahren einfach so gehandhabt, daß allmählich im Laufe von Tagen das betreffende Oxydationsmittel bis zur völligen Oxydation eingetragen und von Zeit zu Zeit an einer Probe die Indolreaktion angestellt wurde. Eppinger hatte bei Oxydation von Alkohol, Milchsäure, Weinsäure, Glycerin, Glykol, Glykolsäure, Betain und Sarkosin im Destillat Glyoxylsäure durch die Indolprobe nachweisen können. Beim Glykokoll gelang sogar die Überführung in Allantoin. Ich habe bei Glycerin, Glykolsäure, Weinsäure, Glykol, Äpfelsäure und, was besonders bemerkenswert ist, auch bei Glykose, positive Resultate erzielt, dagegen nicht bei Propyl- und Isopropylalkohol, Oxybuttersäure, Aceton, Betain.

Doch sind diese negativen Resultate keineswegs maßgebend, da anscheinend die Glyoxylsäure oft nur vorübergehend auftritt, so daß ein Über-

sehen möglich ist. Bei Untersuchung der Oxydationsprodukte stickstoffhaltiger Substanzen, so besonders beim Glykokoll, ist die jetzt gebotene Möglichkeit, Nitrite auszuschließen, von Wichtigkeit, weil der bei der Oxydation frei werdende Stickstoff zum Teil in salpetrige Säure übergeführt wird.

Ferner hat Eppinger beim Kochen von Allantoin mit Alkali Glyoxylsäure erhalten, desgleichen fand Almagia[1]) beim Digerieren von Harnsäure mit Kalilauge positive Indolreaktion. Eine Wiederholung dieser Versuche meinerseits bestätigte dies; beim Allantoin genügte schon längeres Stehen im Brutschrank in alkalischer Lösung. Es wurden daraufhin auch Purinbasen und zwar Xanthin und Hypoxanthin mit Alkali gespalten. Auch sie geben dann Glyoxylsäurereaktion, wenn auch sehr schwach.

3.

Meine weitere Aufgabe war es nun, zu prüfen, welche Rolle die Glyoxylsäure im Säugetierstoffwechsel spielt. Infolge der Vervollkommnung der Methode war es möglich, diese Frage einwandsfreier zu lösen, als es Eppinger vermocht hat.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen und ein Hund. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluß die Nahrung bei Kaninchen ausübt. Es zeigte sich nun, daß bei Kohlfütterung, nicht aber bei anderer Nahrung, ab und zu Spuren von Glyoxylsäure auftraten. Eine Untersuchung des Kohlextraktes ergab einmal eine positive Glyoxylreaktion. Nun ist ja bekannt, daß diese Säure ziemlich häufig in Pflanzen vorkommt, und es liegt daher die Vermutung nahe, daß es doch die eingeführte Glyoxylsäure ist, die da zur Ausscheidung kommt. Allerdings hat Eppinger gezeigt, daß als Kalksalz verfütterte Glyoxylsäure beim Kaninchen nicht im Harn erscheint. Doch zeigte sich bei einem Hunde nach Zufuhr von 5 g Calciumglyoxylat die Indolprobe leicht positiv. Es ist daher ein Übertritt von Glyoxylsäure aus der Nahrung in den Harn nicht ganz auszuschließen. Dafür spricht auch ein Versuch (s. unten), wo ich 0,1 g Calciumglyoxylat per Ohrvene injizierte und positive Reaktion fand. Daß Eppinger meist zu einem negativen Resultate kam, ist wohl, da es sich hier in allen Fällen um sehr geringe Mengen Glyoxylsäure handelt, aus der geringeren Leistungsfähigkeit seiner Nachweismethode im Harn zu erklären.

Die Versuchsanordnung war recht einfach. Die Tiere (Kaninchen) wurden bei reiner Haferfütterung belassen und es wurde vor jedem Versuche sichergestellt, daß der Harn absolut glyoxylsäurefrei war. Dann wurden die betreffenden Substanzen teils per os mit der Schlundsonde, teils per Ohrvene mit der Spritze eingebracht, natürlich in entsprechender Verdünnung. Zu den Versuchen mit intravenöser Injektion wurden geringere Mengen von Substanz genommen, die Lösung sorgfältig neutralisiert, mit einer Spur kohlensauren Alkalis alkalisch und durch Kochsalzzusatz dem Blute isotonisch gemacht.

---

[1]) Diese Beiträge 7, 472.

Infolge dieser Vorsichtsmaßregeln wurden diese Eingriffe im allgemeinen recht gut vertragen.

Gereicht wurden in 27 Versuchen folgende Substanzen:

Per os: Glykokoll 10 g und 15 g; Alkohol (Kaninchen) 5, 18 und 25 ccm; Alkohol (Hund) 20 und 25 ccm; Betain 2 g; glykolsaures Natron 5 g; Glykol 5 g (2 mal); milchsaures Natron 7 g und 10 g; essigsaures Natron $7^1/_2$ g; äpfelsaures Natron 5 g; Aceton 5 ccm; Zucker 50 g.

Per Ohrvene (Kaninchen): Glykol 5 g; Betain 1 g; Glykokoll 2 g (2 mal); milchsaures Natron 4 g; äpfelsaures Natron 2 g; glykolsaures Natron 2 g; Betain 2 g; glyoxylsaures Natron 0,1 g; Allantoin 0,2 g.

Sämtliche Versuche mit Ausnahme der beiden letzten waren vollständig negativ und auch diese beiden waren nur schwach positiv; die Gesamtausscheidung der Glyoxylsäure konnte da nach kolorimetrischer Schätzung nicht viel mehr als 5 bis 10 mg betragen haben.

Diese Beobachtungen stehen zum Teil mit einigen Erfahrungen Eppingers in Widerspruch, der nach Alkohol, Glykokoll, Glykolsäure, Sarkosin und Betain, Glyoxylsäure auftreten sah. Da bei Tierversuchen dieser Art individuelle Verschiedenheiten und nicht übersehbare äußere Bedingungen das Resultat beeinflussen können, so ist die Verschiedenheit meiner Ergebnisse von denen Eppingers nicht ohne weiteres aufzuklären. Jedenfalls aber kann ich den von Eppinger besonders betonten Einfluß der Alkoholdarreichung nicht für eine regelmäßig auftretende Erscheinung ansehen.

Hingegen scheint mir der positive Ausfall nach Allantoindarreichung sehr bemerkenswert, weil er, wie Eppingers Versuche mit Allantoin in vitro und jene Almagias[1]) mit Harnsäure in vivo auf die besprochene Beziehung der Glyoxylsäure zum Harnsäurestoffwechsel hinweist.

4.

Aus den Fütterungsversuchen mit negativem Ergebnis folgt, daß entweder der Abbau der betreffenden Substanzen im Organismus nicht über die Glyoxylsäure erfolgt oder daß, wenn dies doch der Fall ist, sie so schnell zerstört wird, daß sie nur sehr selten im Harn zum Vorschein kommt.

Der Entscheidung dieser Alternative diente eine Versuchsreihe mit Organbrei, von der man Aufschluß über den Ort und die Art dieses eventuellen Abbaues erwarten konnte.

---

[1]) Diese Beiträge 7, 472.

In Anwendung kamen Organe vom Pferde, die spätestens drei Stunden nach dem Schlachten in Bearbeitung genommen wurden, ferner ganz frisch entnommene Organe von Kaninchen.

Die Organe wurden fein zerkleinert, von dem Brei bestimmte Portionen abgewogen, mit entsprechenden Mengen schwach alkalischer Natriumglyoxylatlösung versetzt und innig damit verrührt. In den meisten Fällen wurde das Verhältnis der Glyoxylsäure zum Organbrei wie 1 : 1000, in seltenen Fällen wie 1 : 500 genommen.

Um das den Nachweis der Glyoxylsäure störende Blut und Eiweiß ohne Verlust an unveränderter Glyoxylsäure zu entfernen, wurden sehr verschiedene Fällungsmittel in Anwendung gezogen. Bei weitem am besten entsprach dieser Anforderung, soweit sich kolorimetrischen Schätzungen entnehmen läßt, die Trichloressigsäure.

Behufs Nachweises der unveränderten Glyoxylsäure nach abgeschlossener Digestion wurde der Organbrei zu etwa der Hälfte seines Gewichtes mit gesättigter Trichloressigsäurelösung übergossen und damit in der Reibschale verrieben. Nach etwa 1 bis 3 Minuten war er koaguliert und preßte nun eine glyoxylsäurehaltige Flüssigkeit aus. Diese wurde filtriert, wobei jedoch selten klare Lösungen erhalten wurden, und direkt zu Proben mit Indol und Skatol verwendet.

Die Reaktion begegnet hier größeren Schwierigkeiten als die Probe im Harn, doch genügt sie, da es sich stets um größere Mengen Glyoxylsäure handelt, vollauf. Sehr wichtig ist es hier, die Unterschichtung mit konzentrierter Schwefelsäure möglichst vorsichtig vorzunehmen, weil oft Substanzen (zumal aus der Leber) mit extrahiert werden, die sich (z. B. Glykogen) mit konzentrierter Schwefelsäure rasch schwärzen. Bei größeren Mengen Glyoxylsäure tritt nach einigen Sekunden der charakteristische rote Ring auf, bei kleineren Mengen tut man gut daran, die Probe längere Zeit stehen zu lassen. Tritt dann allmählich eine von dem Berührungsringe aufsteigende rote Färbung auf, so ist Glyoxylsäure da. Eine Verwechselung mit Nitriten ist hier nicht zu befürchten, da die Nitritreaktion nach der Behandlung mit Trichloressigsäure nicht auftritt.

Bei diesen Versuchen ist Skatol weniger brauchbar; zwar tritt bei seiner Verwendung viel schneller ein roter Ring auf, aber er macht bald einer schmutzigen Veilchenblaufärbung Platz, die zur quantitativen Abschätzung nicht zu gebrauchen ist.

In ihrem Verhalten zur Glyoxylsäure wurden geprüft: Leber, Milz, Lunge, Niere, Gehirn, Muskel und Blut. Nachdem sie, wie oben bemerkt, vorbehandelt waren, wurden sie gleich auf ihre Reaktion geprüft und kamen dann in den Brutschrank. Von Zeit zu Zeit wurde dann wieder eine Probe auf ihren Gehalt an Glyoxylsäure untersucht.

Alle Proben wurden stehen gelassen und am Schlusse der Versuchsreihe nach ihrer Farbenintensität abgeschätzt; hierdurch wurden zwar nur grobe, aber immerhin brauchbare Vergleichswerte sowohl für die Wirksamkeit der einzelnen Organe als auch für den Ablauf des Glyoxylsäureverschwindens am einzelnen Organ

gewonnen. Die Resultate aus fünf Versuchsreihen beim Pferde und zwei beim Kaninchen entsprachen sich ziemlich genau.

Die Leber zeigte stets weitaus das stärkste Vermögen Glyoxylsäure zu zersetzen; schon nach 1 bis 2 Stunden war kaum noch eine Reaktion nachzuweisen und nach $2^1/_2$ Stunden war niemals mehr Rotfärbung da.

An die Leber schloß sich unerwarteterweise das Gehirn an, dann folgten Niere und Muskeln. Wenig Wirkung auf die Glyoxylsäure scheinen Lunge und Milz zu haben, gar keine das Blut.

Dieses Verschwinden der Glyoxylsäure ist sicher nicht von bakterieller Zersetzung und anscheinend auch nicht wesentlich von der Sauerstoffzufuhr abhängig, da Proben unter Toluol keine Abweichung im Verhalten erkennen ließen. Wie die Glyoxylsäure zersetzt wird ist noch nicht ermittelt.

Jedenfalls ist aber durch diese Versuche verständlich gemacht, daß die Glyoxylsäure, wenn sie im Stoffwechsel entsteht oder im Blute kreist, rasch verändert wird. Der Ort dieser Veränderung ist wohl hauptsächlich die Leber.

Aber auch nach einer anderen Richtung hin beanspruchen diese Versuche ein höheres Interesse. Zweifellos wird die aufgefundene Umsetzung der Glyoxylsäure durch Fermente bedingt. Handelt es sich, wie ja die nächstliegende Vermutung ist, um einen oxydativen Abbau, so lassen sich die Resultate in Parallele setzen zu den Ergebnissen über die Verbreitung der oxydativen Fermente, namentlich der Aldehydase, wie sie von einer ganzen Reihe von Forschern, hauptsächlich von Schmiedeberg, Jaquet, Pohl, Salkowski und Jacoby und anderen erhalten worden sind. Vielleicht ist indes diese Analogie nur eine scheinbare, denn wenn man die Organe einerseits nach der Intensität ihrer Wirkung auf Glyoxylsäure, andererseits nach ihrer Aldehydasenwirkung ordnet, ergibt sich, von der Leber abgesehen, eine ganz verschiedene Reihenfolge. Weitere im hiesigen Institut begonnene Versuche, die sich ausführlicher mit den hier nur flüchtig gestreiften Verhältnissen beschäftigen sollen, werden hoffentlich über die Beziehung zur Aldehydase und über das Abbauprodukt der Glyoxylsäure Klarheit schaffen.

Die vorliegende Untersuchung hat Ende Februar dieses Jahres in etwas breiterer Ausführung der hiesigen medizinischen Fakultät als Dissertation vorgelegen. (Gedruckt Straßburg i. E., Elsässische Druckerei, vormals G. Fischbach.)

Kurz danach erschien im Märzheft des Journal of biological chemistry **1**, 271, eine Mitteilung von H. D. Dakin, in der er über das Auftreten von Glyoxylsäure bei Oxydation verschiedener Substanzen mit Wasserstoffsuperoxyd berichtet und dabei auf die Fehlerquellen der Hopkinsschen Reaktion bei direkter Anwendung auf den Harn hinweist. Seine tatsächlichen Bemerkungen in dieser Richtung stehen mit Inadas Beobachtungen und meinen eben mitgeteilten Erfahrungen vielfach in Einklang. In bezug auf die Beurteilung der einschlägigen Angaben Eppingers ist es aber billig, daran zu erinnern, daß sich Eppinger, wo es tunlich war, bei dem Nachweis der Glyoxylsäure nicht auf die Farbenreaktionen allein stützte, überdies auf den nur orientierenden Wert der Indolreaktion hinwies und die Notwendigkeit, die „Glyoxylsäure im Harn noch genauer nachzuweisen“ (S. 498), geradezu als „selbsverständlich“ bezeichnete.

XXIX.

Vergleichende chemische Untersuchungen an den Muskeln, den elektrischen Organen und dem Blutserum von Torpedo ocellata.

Von **S. Baglioni.**

Aus der physiologisch-chemischen Abteilung der zoologischen Station zu Neapel.

(Der Redaktion zugegangen am 16. Juli 1906.)

In der allgemeinen Physiologie sowie in der Entwicklungsgeschichte und vergleichenden Anatomie der elektrischen Fische liegt eine genügende Anzahl von Beobachtungstatsachen zur Stütze der Annahme vor, daß die elektrischen Organe ad hoc veränderte Muskeln darstellen. „Es ist aber im höchsten Maße interessant", schreibt Verworn in seiner Allgemeinen Physiologie, „daß diese elektrischen Organe entwicklungsgeschichtlich denselben Ursprung haben wie die quergestreiften Muskeln, mit denen sie auch in ihrer vollständigen Ausbildung noch große Ähnlichkeit besitzen".

Durch die vorliegenden Untersuchungen nahm ich mir nun vor, zu ermitteln, wie sich diese morphologische und entwicklungsgeschichtliche nahe Verwandtschaft zwischen Muskeln und elektrischen Organen in chemischer Hinsicht verhält. Lassen die Muskeln und die elektrischen Organe in ihrer chemischen Zusammensetzung noch erkennen, daß sie so engverwandte Gebilde sind? Andererseits glaubte ich dadurch einen Beitrag zur genaueren Kenntnis der chemischen Stoffe liefern zu können, die anscheinend für das typische Zustandekommen der starken elektromotorischen Kraft dieser Organe notwendig sind.

Die bisherigen chemischen Untersuchungen über die elektrischen Organe beschränken sich auf einige Mitteilungen von Th. Weyl, Marcuse und Röhmann. Bei einer anderen Gelegen-

heit werde ich den geschichtlichen Teil dieses Gegenstandes ausführlich behandeln. Hier will ich nur erwähnen, daß die Untersuchungen von Weyl[1]) (1881) sich sowohl nach rein physiologischer als auch nach rein chemischer Richtung erstreckten: chemisch studierte er die Reaktion des frischen Organs, seine Säuerung, seine CO_2-Produktion, dessen anorganische Stoffe (Wasser und Asche), zum Teil auch die organischen Bestandteile (darunter einen Eiweißkörper: das Torpedomucin). Diese Untersuchungen waren und blieben unvollständig, wie der Verfasser selbst vielfach hervorhob.

Marcuse[2]) suchte unter Heidenhains und Röhmanns Leitung an den elektrischen Organen etwaige chemische Veränderungen, die mit der physiologischen Tätigkeit des Organs in Beziehung stehen, festzustellen. Er stellte die chemische Reaktion des tätigen und ruhenden Organs fest, außerdem bestimmte er den Harnstoffgehalt (1,92 Proz.), suchte vergebens nach Glykogen usw. Röhmann[3]) setzte die Untersuchungen seines Schülers fort: er ermittelte dabei die chemische Reaktion (unter Anwendung von Säurefuchsin), den Harnstoffgehalt (im Durchschnitt 1,70 Proz.), die Menge des Ätherextrakts, des Alkoholextrakts usw. am untätigen und tätigen Organ. Dabei kam er unter anderem zu folgendem Schlusse: „Ich sehe deshalb in der Geringfügigkeit der nachgewiesenen Stoffänderung den Hinweis darauf, daß die Erzeugung des elektrischen Schlages von Torpedo unter Verbrauch einer nur äußerst geringen Menge von potentieller Energie erfolgt."

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen können als Stütze dieser Anschauung dienen, denn, wie wir sehen werden, enthalten tatsächlich die elektrischen Organe — im Gegensatz zu den Muskeln — nur eine spärliche Menge chemischer Stoffe, die mit großer potentieller Energie begabt sind (Eiweißkörper, Kohlenhydrate).

---

[1]) Th. Weyl, Physiologische und chemische Studien an Torpedo. Monatsber. d. k. preuß. Akad. d. Wiss. 1881; ferner: Du Bois-Reymonds Arch. 1883 und Suppl.-Bd., 1884; ferner: Hoppe-Seylers Zeitschr. 7 u. 11.

[2]) W. Marcuse, Beiträge zur Kenntnis des Stoffumsatzes in dem tätigen elektrischen Organ der Zitterrochen, auf Grund experimenteller Studien an der zoologischen Station zu Neapel. Inaug.-Diss., Breslau 1891.

[3]) F. Röhmann, Über den Stoffumsatz in dem tätigen elektrischen Organ des Zitterrochen nach Versuchen an der zoologischen Station zu Neapel. Du Bois-Reymonds Arch. 1893.

Frühere chemische Untersuchungen an Muskeln von Torpedo konnte ich in der Literatur nicht finden.

Vorliegende Untersuchungen wurden, ebenso wie diejenigen meiner oben erwähnten Vorgänger, in der zoologischen Station zu Neapel im Herbst 1905 und Winter 1905/06 ausgeführt, und es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geh. Rat Prof. A. Dohrn, sowie Herrn Dr. M. Henze, dem Leiter der physiologisch-chemischen Abteilung, auch hier meinen warmen Dank auszusprechen.

Mein langer Aufenthalt in der zoologischen Station wurde mir ermöglicht durch die Munifizenz der italienischen Regierung, die mir einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte.

Eigene Untersuchungen.

Meine Untersuchungen erstrecken sich auf die quantitativen Bestimmungen verschiedener chemischer Stoffe, deren Ermittelung mir am interessantesten erschien. Die chemische quantitative Analyse geschah nach den Vorschriften von Hoppe-Seyler-Thierfelder[1]), sowie von Friedheim[2]).

Für die Alkalibestimmung der Muskeln und elektrischen Organe bin ich genau dem Verfahren von Katz[3]) gefolgt. Die Bestimmung der Alkalien, des Gesamtstickstoffs und des Stickstoffs des Wasserauszuges geschah an der Trockensubstanz. Die Bestimmung des Glykogengehalts geschah nach dem neuesten Verfahren von Pflüger (s. unten).

Die lebenden Tiere wurden sorgfältig verbluten gelassen, so daß die Organe möglichst blutfrei zu den chemischen Manipulationen kamen.

Die Untersuchungen wurden selbstverständlich jedesmal an Muskeln und elektrischen Organen desselben Tieres vorgenommen.

1. Wassergehalt.

A. Muskeln.

a) Der Wassergehalt der frischen Muskeln wurde bei der ersten Bestimmung zu 80,79 Proz. gefunden.

2,431 g frischer Muskeln, fein zerschnitten, gaben beim Trocknen bei 100° 0,467 g Trockensubstanz, d. i. in Prozenten 19,21 g.

---

1) Felix Hoppe-Seylers Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 7. Aufl. Berlin 1903.

2) C. Friedheim, Leitfaden für die quantitative chemische Analyse. Berlin 1897.

3) Katz, Pflügers Archiv 63, 1.

b) Ein zweites Mal wurde das Trocknungsverfahren nach Hoppe-Seyler-Thierfelder modifiziert, indem man die frischen Muskeln vor der endgültigen Austrocknung im Trockenkasten zu 100° wiederholt mit absolutem Alkohol versetzte und den Alkohol verdunstete.

Diesmal wurde der Wassergehalt der frischen Muskeln zu 77,96 Proz. gefunden.

3,722 g Muskeln gaben 0,820 g Trockensubstanz, d. i. in Prozenten 22,04 g.

Diese Zahlen stimmen mit den gewöhnlich in den Lehrbüchern für den Wassergehalt der Fischmuskeln angegebenen überein (78 bis 80 Proz., Bottazzi).

B. Elektrische Organe.

α) Der Wassergehalt der elektrischen Organe ergab sich bei der ersten Bestimmung zu 91,20 Proz. des frischen Organes.

3,614 g fein zerschnittener elektrischer Organe derselben Ocellata wie in a) gaben beim Trocknen bei 100° 0,318 g Trockensubstanz, d. i. in Prozenten 8,80 g.

Im Gegensatz zu den Muskeln ließ sich hier sofort der Umstand bemerken, daß die elektrischen Organe wenigstens doppelt so viel Zeit zur vollständigen Austrocknung brauchen als die Muskeln. Außerdem zeichnen sie sich vor den Muskeln durch die Eigentümlichkeit aus, daß ihre Trockensubstanz infolge einer überaus starken Hygroskopizität so rasch und gierig Wasser aus der Luft aufnimmt, daß zu ihrer Pulverisierung notwendig ist, sie noch warm im Mörser zu zerreiben und dann das Pulver im Exsikkator aufzubewahren. Es genügt, etwas von diesem Pulver wenige Minuten der Luft auszusetzen, um eine feuchte flüssige Masse zu erhalten, im Gegensatz zur Trockensubstanz der Muskeln, die nie eine so große Hygroskopizität aufweist.

β) Der Wassergehalt der elektrischen Organe von T. ocellata b), nach demselben Verfahren ausgetrocknet wie ihre Muskeln, wurde zu 91,50 Proz. gefunden.

8,018 g frischer elektrischer Organe gaben 0,681 g Trockensubstanz, d. i. in Prozenten 8,50 g.

Auch hier wurde die überaus größere Wasseranziehung der elektrischen Organe gegenüber den Muskeln deutlich wahrgenommen.

Der von mir gefundene Wassergehalt der elektrischen Organe (91,2 bis 91,5 Proz.) ist also etwas höher, als der seiner Zeit von Weyl festgestellte (88,82 Proz.).

2. Stickstoffgehalt.

Es wurden zwei Untersuchungsreihen ausgeführt: in der ersten wurde der Gesamtstickstoff der Trockensubstanz von Muskeln und elektrischen Organen quantitativ bestimmt, in der zweiten der Stickstoff des Wasserauszuges derselben. Die Bestimmung geschah ausschließlich nach Kjeldahl.

I. Gesamtstickstoff.

A. Muskeln.

a) Zu dieser ersten Bestimmung wurde die nach a) getrocknete Substanz angewendet. Der gefundene Gesamtstickstoffgehalt betrug

15,001 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
2,96 „ „ „ frisches Fleisch.

0,595 g Trockensubstanz gaben 0,0893 g N.

b) Zu dieser zweiten Bestimmung wurde die Trockensubstanz b) benutzt. Der gefundene Gesamtstickstoffgehalt betrug

14,76 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
3,25 „ „ „ frisches Fleisch.

0,186 g Trockensubstanz gaben 0,0274 g N.

Der Gesamtstickstoffgehalt dieser Muskeln ist also ein klein wenig niedriger, als er im allgemeinen für die übrigen Wirbeltiere angegeben wird (3,4 Proz. nach Voit).

B. Elektrische Organe.

α) Zu der ersten Bestimmung wurde ebenfalls die nach α) getrocknete Substanz benutzt. Der gefundene Gesamtstickstoffgehalt betrug

12,012 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
1,06 „ „ „ frisches Organ.

0,472 g Trockensubstanz gaben 0,0567 g N.

β) Zu dieser zweiten Bestimmung wurde die nach β) getrocknete Substanz benutzt. Der gefundene Gesamtstickstoffgehalt betrug

12,596 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
1,07 „ „ „ frisches Organ.

0,189 g Trockensubstanz gaben 0,0238 g N.

Die elektrischen Organe zeichnen sich also gegenüber den Muskeln durch einen bedeutend geringeren Gesamtstickstoffgehalt aus; er entspricht — auf frisches Gewebe bezogen — etwa einem Drittel des im Muskel vorhandenen Gesamtstickstoffs.

II. Stickstoffgehalt des Wasserauszuges.

A. Muskeln.

a) Eine bestimmte Menge der nach a) ausgetrockneten Muskelsubstanz wird auf gewogenem Filter mit 100 ccm Wasser ausgezogen. Es filtriert eine strohgelbliche Flüssigkeit, die, mit Asaprol[1]) versetzt, einen reichlichen, weißen, flockigen Niederschlag (Peptone, Albumosen?) gibt. Wird nochmals

[1]) Vgl. F. Riegel, Wiener klin. Wochenschr. 7, sowie Chem. Zentralblatt 1895, 1896, 1897.

filtriert, so zeigt das Filtrat mit Asaprol oder anderen eiweißfällenden Chemikalien keine Fällung mehr.

Der auf dem ersten Filter gesammelte Rückstand wird getrocknet und gewogen. Diese Stoffmenge stellt die wasserunlöslichen Bestandteile der Muskeltrockensubstanz dar.

Am zweiten Filtrat, d. h. am eiweißfreien, wasserlöslichen Teile der Trockensubstanz wird der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt. Derselbe repräsentiert die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe, in diesem Falle fast ausschließlich Harnstoff.

In dieser ersten Probe betrug der Stickstoffgehalt des Wasserauszuges

4,61 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
0,88 „ „ „ frisches Fleisch.

0,668 g Trockensubstanz (gleich 3,47 g frisches Fleisch) gaben, wie oben behandelt, 0,0308 g N.

b) Zu dieser zweiten Bestimmung wurde eine Menge der nach b) getrockneten Muskelsubstanz angewendet. Behandlung wie oben. Das erste Filtrat zeigt diesmal, mit Asaprol versetzt, nur eine schwache Trübung.

Die wasserlöslichen Bestandteile der Trockensubstanz betrugen 36 Proz.

0,295 g Trockensubstanz (gleich 1,34 g frisches Fleisch), mit 100 ccm Wasser extrahiert, lieferten einen nicht gelösten trockenen Rückstand von 0,189 g, d. i. in Prozenten 64 g.

Der Stickstoffgehalt des eiweißfreien Wasserauszuges betrug

4,13 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
0,90 „ „ „ frisches Fleisch.

0,295 g Trockensubstanz (gleich 1,34 g frisches Fleisch) gaben 0,0122 g N.

Angenommen, daß dieser Stickstoff lediglich Harnstoffstickstoff ist — was bei den Selachiern annähernd zutrifft — so würde der Harnstoffgehalt dieser Muskeln 1,92 Proz., berechnet auf frisches Gewebe, betragen, was mit den früheren Untersuchungen von v. Schröder[1]) (bei Scyllium catulus fand Schröder 1,95 Proz.) übereinstimmt.

B. Elektrische Organe.

a) Zu dieser ersten Probe wurde ebenfalls die nach α) ausgetrocknete Substanz der elektrischen Organe verwendet, und ganz wie die Muskelsubstanz behandelt. Es geht in diesem Falle eine wie schwacher Kaffeeinfus gefärbte Flüssigkeit durch das Filter: die Filtration findet schneller statt, als bei der Muskelsubstanz. Die filtrierte Flüssigkeit, mit Asaprol versetzt, läßt ebenfalls einen reichlichen flockigen Niederschlag fallen. Sie wird nochmals filtriert, ehe sie zur N-Bestimmung verwendet wird.

Der erste Rückstand, getrocknet und gewogen, wird von ein wenig schwarzem Pulver gebildet, das die Hygroskopizität vollständig verloren hat.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 14, 1890.

In dieser ersten Probe fand ich den Stickstoffgehalt des eiweißfreien Wasserauszuges zu

8,63 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
0,76 „ „ „ frisches Organ.

0,675 g Trockensubstanz (gleich 7,67 g frisches Organ) gaben 0,058 g N.

b) Zu dieser zweiten Probe wurde ein Teil der nach β) getrockneten elektrischen Organe angewendet. Behandlung wie oben. Das erste Filtrat zeigt auch diesmal (vgl. Muskeln), mit Asaprol versetzt, einen kaum wahrnehmbaren, überaus schwachen Niederschlag.

Die wasserlöslichen Bestandteile der Trockensubstanz betrugen etwa 76 Proz.

0,308 g Trockensubstanz (gleich 3,62 g frisches Organ), mit 100 ccm Wasser extrahiert, lieferten einen ungelösten trockenen Rückstand von 0,075 g, d. i. 24 Proz.

Der Stickstoffgehalt des eiweißfreien Wasserauszuges betrug

9,78 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
0,80 „ „ „ frisches Organ.

0,308 g Trockensubstanz (gleich 3,62 g frisches Organ) gaben 0,0291 g N.

Nimmt man an, daß dieser Stickstoff lediglich Harnstoffstickstoff ist, was, wie erwähnt, bei diesen Tieren wohl sehr annähernd zutrifft, so würde der Harnstoffgehalt der elektrischen Organe 1,71 Proz. betragen (auf frisches Organ berechnet), was wiederum mit den Untersuchungsergebnissen von Röhmann (s. oben) in befriedigender Übereinstimmung steht.

Daraus ergibt sich, 1. daß von den sämtlichen stickstoffhaltigen Stoffen, die in der Trockensubstanz der Muskeln vorhanden sind, viel weniger als ein Drittel als wasserlösliche eiweißfreie stickstoffhaltige Substanz auftritt. Von einem Gesamtstickstoff von 3,25 Proz. (berechnet auf frisches Fleisch) erscheinen bloß 0,90 Proz. im eiweißfreien Wasserauszuge.

Nimmt man an, daß der N-Rest (= 2,35 Proz.) Eiweißkörpern angehört, so findet man durch Berechnung (auf frisches Organ), daß in diesen Muskeln 15,4 Proz. Eiweißkörper vorhanden sind, was wieder mit den allgemeinen Angaben über den Eiweißgehalt der Wirbeltiermuskeln übereinstimmt.

2. Für die elektrischen Organe steht die Sache wohl anders. Von den sämtlichen stickstoffhaltigen Stoffen, die in der Trockensubstanz der elektrischen Organe vorhanden sind, entfallen beinahe 4/5 auf wasserlösliche eiweißfreie stickstoffhaltige Substanzen. Denn von einem Gesamtstickstoff von 1,07 Proz. (des frischen Organs) erscheinen 0,80 Proz. im Wasserauszug.

Nimmt man an, daß der übrige Stickstoff (= 0,27 Proz.) Eiweißkörpern gehört, so kann man daraus berechnen, daß in den

elektrischen Organen 2,25 Proz. (auf frisches Organ berechnet) Eiweiß enthalten ist.

Daraus kann man schließen, daß die elektrischen Organe im Vergleich mit den Muskeln bedeutend eiweißärmer sind, was übrigens mit ihrem Wassergehalt und dem Prozentsatz der wasserlöslichen Bestandteile ihrer Trockensubstanz in Einklang steht.

3. **Gehalt an Alkalien** (Kalium und Natrium).

Die im folgenden mitgeteilten quantitativen Bestimmungen der mineralischen Bestandteile der Muskeln und der elektrischen Organe wurden ausschließlich im Hinblick auf die Verteilung der Alkalien ausgeführt. Schon lange kennt man das eigentümliche Verhalten der Wirbeltiermuskeln in dieser Hinsicht, die auffallend reicher sind an Kaliumverbindungen als an Natriumverbindungen, im Gegensatz zum Blutplasma und anderen Organen. Wie verhalten sich nun in dieser Hinsicht die den Muskeln verwandten elektrischen Organe?

Zur Lösung dieser Frage wurden die folgenden Untersuchungen ausgeführt. Die Bestimmungen geschahen ganz nach den Vorschriften von Katz und Hoppe-Seyler-Thierfelder, so daß ich hier nichts Weiteres hinzuzufügen brauche.

Alle Bestimmungen wurden an der Trockensubstanz angestellt, und zwar zum Teil an der nach a) oder α), und zum Teil an der nach b) oder β) getrockneten Substanz. Die Veraschung erfolgte stets in Platingefäßen.

A. Muskeln.

a) Nach a) getrocknete Muskelsubstanz.

1,887 g Trockensubstanz (gleich 9,8 g frisches Fleisch) lieferten 0,082 g Alkalichloride (NaCl + KCl), d. h.

4,3 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
0,83 „ „ „ frisches Fleisch.

b) Nach b) getrocknete Muskelsubstanz.

1,060 g Trockensubstanz (gleich 4,8 g frisches Fleisch) lieferten 0,036 g Alkalichloride (NaCl + KCl) und 0,047 g Kaliumplatinchlorid (K_2PtCl_6).

Daraus berechnen sich:

1. 3,4 Proz. Alkalichloride auf Trockensubstanz,
   0,75 „ „ „ frisches Fleisch.
2. KCl = 0,014 g, K = 0,007 g,
   NaCl = 0,022 g, folglich Na = 0,008 g,

d. h. in Prozenten auf frisches Fleisch

K = 0,146 und Na = 0,166 (?) .

c) Nach b) getrocknete Muskelsubstanz.

1,248 g Trockensubstanz (gleich 6,1 g frisches Fleisch) gaben 0,0585 g Alkalichloride (NaCl + KCl) und 0,110 g Kaliumplatinchlorid.

Daraus berechnen sich:

1. 4,6 Proz. Alkalichloride auf Trockensubstanz,
   0,95 „ „ „ frisches Fleisch.

2. KCl = 0,033 g, K = 0,017 g,
   NaCl = 0,025 g, folglich Na = 0,009 g,

d. h. in Prozenten auf frisches Fleisch

K = 0,278 und Na = 0,147.

B. Elektrische Organe.

a) Nach α) getrocknete Substanz.

1,905 g Trockensubstanz (gleich 21,6 g frisches Organ) gaben 0,227 g Alkalichloride (NaCl + KCl), d. h.

11,9 Proz. berechnet auf Trockensubstanz,
1,05 „ „ „ frisches Organ.

b) Nach β) getrocknete elektrische Organe.

0,827 g Trockensubstanz (gleich 9,7 g frisches Organ) gaben 0,129 g Alkalichloride (NaCl + KCl) und 0,056 g Kaliumplatinchlorid.

Daraus berechnen sich:

1. 15,3 Proz. Alkalichloride auf Trockensubstanz,
   1,32 „ „ „ frisches Organ.

2. KCl = 0,017 g, K = 0,009 g,
   NaCl = 0,112 g, folglich Na = 0,044 g,

d. h. in Prozenten auf frisches Organ

K = 0,09 und Na = 0,41.

c) Nach β) getrocknete Substanz.

0,990 g Trockensubstanz (gleich 11,6 g frisches Organ) gaben 0,157 g Alkalichloride (NaCl + KCl) und 0,0645 g Kaliumplatinchlorid.

Daraus berechnen sich:

1. 15,8 Proz. Alkalichloride auf Trockensubstanz,
   1,36 „ „ „ frisches Organ.

2. KCl = 0,019 g, K = 0,010 g,
   NaCl = 0,138 g, folglich Na = 0,053 g,

d. h. in Prozenten auf frisches Organ

K = 0,086 und Na = 0,448.

Daraus ergibt sich, 1. daß die elektrischen Organe im Vergleich zu den Muskeln bedeutend mehr Alkalien (bzw. Alkalisalze) enthalten als die Muskeln, und 2. daß im Gegensatz zu den Muskeln der Na-Gehalt den K-Gehalt in den elektrischen Organen bei weitem überwiegt.

4. Gehalt an Glykogen.

Die Frage, ob die elektrischen Organe ebenfalls wie die Muskeln Glykogen enthalten, bietet ein besonderes Interesse; deswegen stellte ich die folgenden quantitativen Bestimmungen an. Nach deren Ausführung fand ich in der Literatur, daß sich schon Marcuse die Lösung dieser Frage vorgenommen hatte: er kam aber zu anderen Resultaten als ich, denn er behauptete, die Gegenwart von Glykogen nicht nachgewiesen zu haben. „Das mit Alkohol", schreibt er, „extrahierte Organ wird auf dem Wasserbade vom Alkohol befreit und in Kalilauge gelöst. Diese Lösung wird mit Salzsäure und Jodkaliumquecksilber gefällt, der Niederschlag filtriert, das Filtrat ist wasserklar und gibt mit Alkohol keine Fällung, enthält also kein Glykogen oder ein diesem ähnliches Kohlehydrat." Diese Methode, wie man später nachgewiesen hat, ist aber nicht besonders geeignet, um kleine Mengen Glykogen nachzuweisen, die, wie hier der Fall ist, durch die Manipulation leicht zerstört werden.

Meine Untersuchungen wurden ausschließlich und ganz genau nach der neuesten Methode von Pflüger[1]) ausgeführt.

Es wurden immer 100 g ganz frischer noch lebender Muskeln bzw. ganz frischer noch lebender elektrischer Organe aus derselben Torpedo ocellata mit 100 ccm 60 proz. Kalilauge gekocht usw. Nach Alkoholzusatz erhielt man ausnahmslos — sowohl an den Muskeln, wie an den elektrischen Organen — einen reichlichen (besonders an den Muskeln) weißen staubigen Niederschlag, dessen wässerige Lösung ganz wie eine schwache Glykogenlösung (opaleszierend) aussah. Nach Inversion durch Salzsäure wurde die Flüssigkeit auf 50 ccm eingeengt und der Glykogengehalt sowohl mit dem Polarimeter als auch durch Titrierung nach Fehling bestimmt.

Die Tiere befanden sich im Hungerzustande. Eine erste Probe — die hier nicht angegeben wird — wurde zur qualitativen Analyse angestellt, sie fiel sowohl für die Muskeln wie für die elektrischen Organe positiv aus. Diese Untersuchungen wurden im Dezember 1905 und Januar 1906 ausgeführt.

A. Muskeln.

a) 100 g lebender Muskeln aus zwei mittelgroßen Torpedo ocellata.

Der Glykosegehalt, am Polarimeter bestimmt, beträgt 0,20 Proz., daraus berechnet man einen Glykogengehalt von 0,18 Proz.

Durch Titration nach Fehling ergibt sich der Glykosegehalt zu 0,16 Proz., was einem Glykogengehalt von 0,14 Proz. entspricht.

---

[1]) Pflüger, Richets Dictionnaire, p. 295, t. VII, 1905; sowie Pflügers Arch. 103, 1904.

b) 100 g lebender Muskeln aus zwei Torpedo ocellata.

Am Polarimeter wurden 0,108 Proz. Glykose gefunden, entsprechend 0,10 Proz. Glykogen.

Die Titration nach Fehling ergibt 0,155 Proz. Glykose, entsprechend 0,143 Proz. Glykogen.

B. Elektrische Organe.

a) 100 g elektrischer Organe derselben zwei Torpedo ocellata, denen die Muskeln zur Bestimmung a) entnommen worden waren.

Polarimetrisch wurden 0,16 Proz. Glykose gefunden, entsprechend einem Glykogengehalt von 0,14 Proz.; titrimetrisch 0,10 Proz. Glykose, entsprechend 0,09 Proz. Glykogen.

b) 100 g elektrischer Organe derselben zwei Torpedo ocellata, von denen die Muskeln b) stammen.

Am Polarimeter wurden 0,104 Proz. Glykose gefunden, entsprechend 0,095 Proz. Glykogen.

Die Titration nach Fehling ergibt 0,091 Proz. Glykose, entsprechend 0,084 Proz. Glykogen.

Bei den geringen Glykosemengen verdient selbstverständlich die chemische quantitative Methode (Fehling) mehr Vertrauen als die physikalische (Polarimeter).

Wir können also schließen, 1. daß die elektrischen Organe ebenso wie die Muskeln Glykogen enthalten, und 2. daß die in den elektrischen Organen enthaltene Glykogenmenge (etwa 0,09 Proz.) nicht allzu sehr hinter dem Glykogengehalt des Muskels (etwa 0,14 Proz.) zurückbleibt.

5. Einiges über die Eiweißkörper und die sonstigen Bestandteile des Muskelsaftes und des Saftes der elektrischen Organe.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen über die Eiweißkörper der Muskeln und der elektrischen Organe betreffen nur einen geringen Bruchteil der chemischen Untersuchungen, die man in dieser Richtung ausführen könnte. Es war aber nicht meine Absicht, diese normalen Bestandteile — die ja das Hauptinteresse der Physiologen verdienen — genauer zu studieren, zumal da wir in diesem Gebiete der Chemie noch ganz im Dunkel sind.

Die Untersuchungen wurden am ausgepreßten Saft von frischen Muskeln und elektrischen Organen angestellt. Unter Anwendung einer sehr kräftigen Handfleischpresse (von Dr. Klein, „Alexanderwerk“) wurden sowohl fein zerschnittene, noch lebende, sorgfältig von Blut befreite Muskeln von Torpedo, wie ihre elektrischen Organe unter denselben Bedingungen ohne jeglichen Zusatz ausgepreßt.

Die Versuche wurden im Januar 1906 und zwar nicht nur an Torpedo ocellata, sondern auch an Torpedo marmorata ausgeführt. Temperatur der Umgebung 15 bis 16° C.

Es wurden im ganzen drei solcher Untersuchungen angestellt, das eine Mal an Torpedo ocellata, die zwei anderen Male an Torpedo marmorata. Hier will ich nun die Hauptergebnisse kurz zusammenfassen.

A. Muskeln.

Der so gewonnene Muskelsaft ist eine durchsichtige, schwach rötlich gefärbte Flüssigkeit, die immer in geringerer Menge gewonnen wird als bei dem betreffenden elektrischen Organ. Die Reaktion dieses Saftes ist — mit Lackmuspapier geprüft — schwach alkalisch. Sich selbst überlassen, zeigt er nach einigen Stunden einen schwachen Niederschlag; wenn man aber die Flüssigkeit umrührt, so wird sie wiederum homogen. Es handelt sich hier also um keine wahre spontane Gerinnung.

Die Flüssigkeit enthielt 2,47 Proz. feste Bestandteile (eine Bestimmung), ihr Gehalt an Eiweißkörpern beträgt (mit Alkohol und Hitze ausgefällt) 1,63 Proz. (eine Bestimmung).

Einmal wurde auch der Gehalt an Alkalien bestimmt: dabei wurden folgende Zahlen erhalten: die sämtlichen Alkalichloride betrugen 0,43 Proz. und zwar K = 0,058 Proz. und Na = 0,331 Proz.

Daraus ergibt sich, daß Kalium mehr an die festen Muskelbestandteile gebunden ist (vgl. S. 463 u. 464).

Auf verschiedene Temperaturgrade gebracht, zeigt der Muskelsaft verschiedene Fällungen von Eiweißkörpern.

Die erste Fällung erhält man bei 48 bis 50° C; eine zweite Fällung findet dann bei 62 bis 63° C statt, und schließlich erhält man noch eine dritte Fällung bei höherer Temperatur (80° C). Alle die so entstandenen Eiweißniederschläge sind flockig und scheiden sich sehr scharf von der Flüssigkeit ab, so daß man in allen Fällen ein klares Filtrat bekommt.

Zusatz von absolutem Alkohol, von Asaprol, von einem Tropfen Essigsäure bedingen ebenfalls grobflockige Niederschläge, die sich nach einiger Zeit am Boden der Eprouvette unterhalb einer klaren Flüssigkeit ansammeln.

B. Elektrische Organe.

Der auf dieselbe Weise ausgepreßte Saft der elektrischen Organe ist eine schwach milchige rötliche Flüssigkeit, die immer in größerer Menge gewonnen wird als die der betreffenden Muskeln. Die Reaktion dieses Saftes — mit Lackmuspapier ge-

prüft — ist deutlich alkalisch, bedeutend alkalischer als die des Muskelsaftes und des Blutserums. Sich selbst überlassen, kann auch dieser Saft nach einigen Stunden einen schwachen Niederschlag zeigen, der aber wiederum keine eigentliche Gerinnung darstellt, denn man bringt denselben durch Umrühren wiederum zum Verschwinden.

Der Gehalt an festen Bestandteilen beträgt etwa 6 Proz. (zwei Bestimmungen: 6,54 bzw. 5,44 Proz.); der Rückstand ist ebenfalls sehr hygroskopisch.

Der Gehalt an Eiweiß (mit Alkohol und Hitze ausgefällt) beträgt 0,98 Proz. (zwei Bestimmungen: 1,06 bzw. 0,90 Proz.). Dieser Eiweißrückstand ist nicht hygroskopisch.

Die erste Eiweißfällung an diesem Saft erhält man erst bei 60° C. Es entsteht eigentlich eine Trübung, die immer deutlicher wird, je höher erwärmt wird; es bildet sich aber kein flockiger Niederschlag, so daß man auch kein klares Filtrat erhält.

Zusatz von Alkohol bedingt hingegen auch hier einen leicht abscheidbaren Niederschlag, ebenso Asaprol.

Zusatz von Essigsäure bedingt eine Trübung und kein wahres Gerinnsel.

6. Untersuchungen am Blutserum.

Um weitere Anhaltspunkte zur Vergleichung der chemischen Zusammensetzung von Muskeln und elektrischen Organen beizubringen, will ich folgende chemische Bestimmungen am Blutserum desselben Tieres hier anführen.

Das Blut wurde durch Abschneiden des Schwanzes aus der Art. vertebralis gewonnen: es wurde dann defibriniert und zentrifugiert. Das so entstandene Blutserum war eine klare rötlich gefärbte Flüssigkeit, die, mit Lackmuspapier geprüft, schwach alkalisch (wie der Muskelsaft) reagierte.

Der Wassergehalt wurde im Durchschnitt aus zwei solchen Bestimmungen zu 91,7 Proz. gefunden.

I. 8,276 g Serum aus zwei T. ocellata gaben 0,625 g Trockensubstanz, d. h. in Prozenten 7,8.

II. 7,800 g Serum aus einer großen T. ocellata gaben 0,688 g Trockensubstanz, d. h. in Prozenten 8,8.

Von diesem zweiten Blutserum bestimmte ich ferner den Gehalt an Eiweißkörpern (mit Alkohol und Hitze gefällt), der 2,74 Proz. betrug.

Von der ersten sowie von der zweiten Trockensubstanz wurden die Alkalien bestimmt.

Dabei erhielt man folgende Ergebnisse:

I. 0,408 g Trockensubstanz (gleich 5,23 g Serum) lieferten 0,122 g Alkalichloride (NaCl + KCl) und 0,019 g Kaliumplatinchlorid.

Daraus berechnen sich:

1. 2,33 Proz. Alkalichloride.

2. KCl = 0,0058 g, K = 0,003 g,
NaCl = 0,116 g, folglich Na = 0,045 g,

d. h. in Prozenten

K = 0,057 und Na = 0,879.

II. 0,4965 g Trockensubstanz (gleich 5,6 g Serum) gaben 0,123 g Alkalichloride (NaCl + KCl) und 0,021 g Kaliumplatinchlorid.

Daraus berechnen sich:

1. 2,19 Proz. Alkalichloride.

2. KCl = 0,006 g, K = 0,003 g,
NaCl = 0,117 g, folglich Na = 0,046 g,

d. h. in Prozenten

K = 0,053 und Na = 0,821.

Ferner will ich hier noch die Ergebnisse einiger N-Bestimmungen, die ich am enteiweißten (mit Alkohol und Hitze behandelten oder mit Asaprol versetzten) Blutserum von Torpedo in Zusammenhang mit ähnlichen Untersuchungen an den Körperflüssigkeiten verschiedener anderer Seetiere[1]) ausführte, angeben.

I. Torpedo ocellata, trächtig.

3,6 ccm Blutserum werden mit Alkohol und Hitze enteiweißt. Das Filtrat enthält 0,0312 g N, d. h. in Prozenten 0,867 g.

Angenommen, daß dieser Stickstoff dem im Blutserum enthaltenen Harnstoffe angehört, so würde der Harnstoffgehalt des Blutserums dieses Tieres 1,85 Proz. betragen.

II. Torpedo marmorata, trächtig.

2,7 ccm Blutserum werden mit Alkohol und Hitze enteiweißt und 2,7 ccm desselben Blutserums werden zu demselben Zwecke mit Asaprol versetzt.

Im ersten Fall enthielt die eiweißfreie Flüssigkeit 0,0260 g N, d. h. in Prozenten 0,96 g.

Im zweiten Fall wurden 0,0261 g N gefunden, d. h. ebenfalls 0,96 g.

Der Harnstoffgehalt dieses Blutserums würde dann 2,05 Proz. betragen.

Diese Harnstoffzahlen stimmen sehr gut mit den einschlägigen älteren Untersuchungen an Selachiern[2]) überein.

---

[1]) Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werde ich später in einer anderen Mitteilung wiedergeben.

[2]) Vgl. z. B. v. Schröder, Zeitschr. f. physiol. Chemie **14**, 576 (1890), sowie Baglioni, Zentralbl. f. Phys. **19** (1905) und **20** (1906), sowie Zeitschr. f. allgem. Physiol. 6.

Zusammenfassung und Schlüsse.

In der nachstehenden Tabelle habe ich alle von mir durch die vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Daten zusammengestellt.

Tabelle.

Substanz in Prozenten	Frische Muskeln	Frische elektrische Organe	Muskelsaft	Saft der elektr. Organe	Blutserum	Bemerkungen
Wasser	77,96	91,50	97,53	94,00	91,70	Für Muskeln und elektrische Organe wurden hier ausschließlich die an nach b) (vgl. S. 459) getrockneter Substanz erhaltenen Zahlen in Betracht gezogen.
Trockensubstanz	22,04	8,50	2,47	6,00	8,30	
Gesamtstickstoff	3,25	1,07	—	—	—	
Stickstoff der eiweißfreien, wasserlöslichen Bestandteile	0,90	0,80	—	—	0,91	
Aus diesem N berechneter Harnstoffgehalt	1,92	1,71	—	—	1,94	Unter Annahme, daß sämtl. N zu Harnstoff gehört.
Aus dem übrigen N berechneter Gehalt an Eiweißkörpern	15,40	2,25	—	—	—	Angenommen, daß dieser N ausschließl. den Eiweißkörpern des Organes gehört.
Direkt bestimmter Gehalt an Eiweißkörpern	—	—	1,63	0,98	2,74	
Glykogen	0,14	0,09	—	—	—	
Kalium	0,28	0,09	0,06	—	0,05	
Natrium	0,15	0,43	0,33	—	0,85	

Daraus ergeben sich folgende Hauptschlüsse:

1. Die chemische Zusammensetzung der elektrischen Organe von Torpedo ist trotz der engen entwicklungsgeschichtlichen und morphologischen Verwandtschaft eine durchaus andere als die der Muskeln desselben Tieres: was sicher als eine chemische Differenzierung anzusehen ist, die mit ihrer normalen elektrischen Funktion zusammenhängt.

2. In der allgemeinen chemischen Zusammensetzung nähern sich die elektrischen Organe hingegen sehr derjenigen des Blutserums desselben Tieres.

3. Denn im Gegensatz zu den Muskeln sind sie sehr wasserreich und sehr arm an Eiweißkörpern.

4. Sie zeichnen sich ferner durch einen verhältnismäßig großen Alkalisalzgehalt aus, unter denen — im Gegensatz zu den Muskeln — Natrium bei weitem überwiegt.

5. Die Verteilung des leicht diffusiblen, bei diesen Tieren so reichlich vorkommenden Harnstoffs erweist sich sowohl in den Muskeln, wie in den elektrischen Organen und dem Blutserum beinahe gleichmäßig.

6. Die elektrischen Organe enthalten Glykogen, jedoch in etwas geringerer Menge als die Muskeln.

XXX.

Warum trübt sich der Harn beim Kochen?

(Ein Beitrag zur Lehre von der Acidität des Harns.)

Von Dr. **H. Malfatti.**

Es ist eine bekannte, besonders bei Anstellung der Kochprobe auf Eiweiß häufig beobachtete Erscheinung, daß manche Harne beim Erhitzen sich trüben. Nach dem Erkalten pflegen solche getrübte Harnproben allmählich wieder klar zu werden, das heißt, der Niederschlag, sofern er nicht etwa aus Eiweiß bestand, löst sich wieder auf, und nur in einzelnen Fällen, wenn nämlich der ursprüngliche Harn sehr wenig sauer war, bleibt ein Teil des entstandenen Niederschlages ungelöst. Wie groß die Empfindlichkeit recht schwach saurer Harne für erhöhte Temperatur ist, zeigt die Beobachtung, die man hin und wieder machen kann, daß nämlich ein Harn trüb entleert wird, beim Abkühlen von Körper- auf Zimmertemperatur aber sich vollkommen klärt.

Die Erklärung dieser Erscheinung, die zwar besonders in der Reihe der Kalksalze manche Analogien hat, bietet Schwierigkeiten. Das Nächstliegende war wohl, daran zu denken, daß beim Erhitzen des Harnes eine flüchtige Säure — Kohlensäure — entweiche, daß der Harn so alkalisch werde, und die unlöslichen Kalkphosphate ausfallen lasse.

Dieser Ansicht widerspricht aber die Wiederauflösbarkeit des Niederschlages in der Kälte, und der Umstand, daß im Harne gewöhnlich nur so wenig Kohlensäure vorhanden ist, daß ihr Entweichen keine zur Ausfällung der Phosphate genügende Alkaleszenzvermehrung hervorrufen könnte. Seit also Stokvis[1]) die erwähnte Annahme widerlegt hat, wird in den gebräuchlichen Lehrbüchern

---

[1]) Malys Jahresberichte 12, 199.

zur Erklärung des rätselhaften Trübwerdens der Harne die Eigenschaft der Kalkphosphate herangezogen, sehr leicht in die unlöslicheren neutralen und selbst basischen Phosphate überzugehen unter Abgabe von sauren Bestandteilen etwa nach dem Schema

$$4\,CaHPO_4 = Ca_3(PO_4)_2 + CaH_4(PO_4)_2.$$

Bei näherem Zusehen aber zeigt sich, daß auch diese Ansichten zur Erklärung der Erscheinung nicht ausreichen. Bei allen den herangezogenen Reaktionen muß nämlich neben dem Auftreten eines unlöslichen kalkreicheren Salzes auch das Auftreten eines löslichen phosphorsäurereicheren Bestandteiles erfolgen; die von dem in der Hitze gebildeten Niederschlage getrennte Flüssigkeit müßte also stärker sauer reagieren als vorher.

Wird aber der Harn daraufhin untersucht, so stellt sich heraus, daß das nicht der Fall ist. Im Gegenteil, der unter Vermeidung von Verdunstung erhitzte und von dem gebildeten Niederschlage getrennte Harn zeigte dieselbe, häufig auch eine etwas geringere Acidität (bis ungefähr $^1/_2$ ccm Zehntelnormallauge) als der nicht erhitzte Harn. Dieser geringe Aciditätsverlust dürfte wohl auf Kohlensäureabgabe zurückzuführen sein, denn auch beim längeren Stehen des Harnes an der Luft, beim Filtrieren usw. tritt eine ähnliche Verminderung der Acidität ein. Keinesfalls aber ist diese Aciditätsverminderung ausreichend, um die Fällung der Erdphosphate zu erklären; denn wenn dem Harne in solchen Fällen jene Menge von Lauge beigemischt wird, die der Säureverminderung beim Kochen entspricht, so tritt keinerlei Trübung auf.

Man kann also schematisch sagen, daß das Trübwerden des Harnes beim Kochen ohne eine Reaktionsänderung vor sich geht. Daher ist eine Selbstzersetzung der Kalkphosphate im erwähnten Sinne wohl nicht annehmbar. Hingegen ist das Verhalten der löslichen Alkaliphosphate bei Temperaturerhöhungen wohl imstande, die fragliche Erscheinung zu erklären.

Wird z. B. Wasser mit Phenolphtaleïn versetzt und dann eine Probe mit möglichst wenig Lauge, eine zweite Probe aber mit Natronphosphat eben rötlich gefärbt, so erblaßt die erste Probe beim Erhitzen, die zweite aber wird immer deutlicher rot; beim Erkalten stellt sich in beiden Proben die ursprüngliche Färbung wieder ein. Die Ursache dieser Rotfärbung der zweiten Probe ist also nicht in einer verstärkten Ionisation des Phenolphtaleïns in der Wärme zu suchen, sondern muß auf Kosten des Phosphates erfolgen; ganz ähnliche, nur nicht so leicht reversible Reaktionen

kann man auch bei Verwendung anderer schwach alkalisch reagierender Salze unter den nötigen Kautelen beobachten. Z. B. bei Borax, kohlensaurem Kalk, doppeltkohlensaurem Natron usw. Natronkarbonat selbst aber verhält sich ähnlich wie Kalilauge, d. h. die schwache Phenolphtaleïnfärbung verblaßt in der Wärme.

Deutlicher wird aber die erwähnte Reaktion, wenn man stärkere Lösungen von sekundärem Natriumphosphat mit Säure titriert, bis die Farbe eben verschwindet. Wird dann die erhaltene Flüssigkeit erwärmt, so färbt sich die Flüssigkeit stark rot, um beim Abkühlen sich wieder zu entfärben. Bei dieser Versuchsanordnung läßt sich die Reaktion auch messend verfolgen, indem man bei verschiedenen Temperaturen neue Säure zufügt bis die Rotfärbung wieder verschwindet.

10 ccm einer $^1/_{10}$-normalen Lösung von sekundärem Natriumphosphat wurden in einer Eprouvette (im Becherglas sind die Farbenumschläge allzuschwer sichtbar) mit Phenolphtaleïn und einer $^1/_{10}$ normalen Lösung von primärem Kaliumphosphat titriert und verbrauchten davon bis zum Verschwinden der Rotfärbung bei 10° 0,9 ccm, bei 25° 1,5, bei 40° 2,1, bei 50° 2,5, bei 60° 3,0, bei 70° 3,6, bei 80° 4,3, bei 90° 5,6 und endlich beim Sieden der Flüssigkeit 7,5 ccm [1]).

Nach dem Abkühlen der so erhaltenen Flüssigkeiten zeigten sie gegen Lackmus noch schwach alkalische Reaktion, gegen Phenolphtaleïn aber waren sie so stark sauer, daß zur Titration ebensoviel Lauge verbraucht wurde, als dem zugesetzten primären Phosphat entsprach.

Mit anderen Worten, während des Erhitzens stieg die Alkalität einer etwa 1,5 proz. Lösung von sekundärem Natriumphosphat auf ungefähr das Achtfache des ursprünglichen Titerwertes. Wenn also in einer Flüssigkeit, welche primäres und sekundäres Phosphat in solcher Mischung enthält, daß sich Kalksalze noch in Lösung erhalten können, durch Erwärmen der Alkalität recht beträchtlich gesteigert wird, so ist nicht zu verwundern, daß in der Hitze die Kalksalze als sekundäres Phosphat, also als Niederschlag, sich abscheiden.

---

[1]) Ich führe absichtlich nicht die Mittelzahlen aus meinen verschiedenen Versuchen an, sondern jenen Versuch, den ich für am besten gelungen und für besonders typisch halte, besonders deshalb, weil die Differenzen der Säuremengen für je 10° Unterschied vielleicht zufällig so regelmäßig verlaufen. 0,4 ccm für die Temperaturintervalle unter 50, dann von 50° an, — 0,5, — 0,6, — 07, — 1,3, endlich 1,9 ccm. Die angegebenen Zahlen sind auf 10 ccm Flüssigkeit umgerechnet. Der Versuch selbst war mit 20 ccm Phosphatlösung ausgeführt worden.

In einem anderen Versuche hatte ich bei 0° 0,4 ccm der sauren Lösung für 10 ccm der Phosphatlösung verbraucht.

Um den Mechanismus der Reaktion sich vorstellbar zu machen, genügt es, auf die übliche Erklärung der alkalischen Reaktion des theoretisch sauren sekundären Phosphats zurückzugreifen. Dieses dissoziiert nämlich in Wasser gelöst zu $2\,Na^{\cdot}$ und HPO_4'' und ist in diesem Zustande acidimetrisch unwirksam. Ein kleiner Teil, bei Zimmertemperatur etwa ein Zehntel, der HPO_4-Ionen tritt mit den Bestandteilen des Wassers H und OH in Reaktion; es bildet sich das Ion H_2PO_4' und Hydroxylionen werden in Freiheit gesetzt, wodurch eben die alkalische Reaktion bedingt wird. Wird nun die Temperatur gesteigert, so wird diese Hydrolyse außerordentlich gesteigert. Ein großer Teil der vorhandenen, für Phenolphtaleïn unwirksamen Ionengruppen $Na_2^{\cdot\cdot}—HPO_4''$ verwandelt sich bei 100° in die Ionengruppe $Na_2^{\cdot\cdot}—H_2PO_4'—OH^{\cdot}$ und wirkt als solche wie ein Alkali.

Auf Kosten einer „neutralen“ Verbindung also entsteht in der Wärme eine alkalisch reagierende; beim Erkalten aber kehrt alles wieder zum alten zurück. Selbst wenn in der Wärme eine Ausfällung etwa vorhandener Kalksalze stattfinden sollte, wird nach dem Erkalten eine Änderung der Reaktion nicht nachweisbar sein, denn alle nach der Gleichung

$$Na_2^{\cdot\cdot}—H_2PO_4'—OH^{\cdot} + Ca—Cl_2 = PO_4HCa + 2\,NaCl + H_2O$$

entstehenden Körper sind acidimetrisch ebenso unwirksam wie das ursprünglich vor dem Erwärmen vorhandene $Na_2^{\cdot\cdot}—HPO_4''$; nur die absolute Menge dieses letzteren ist vermindert.

Daß sich das gebildete sekundäre Calciumphosphat im Harne selbst — wohl wegen der Anwesenheit löslicher primärer Phosphate — nicht in merkbarem Maße in tertiäres Kalkphosphat umlagert, beweist wohl zur Genüge der Umstand, daß sich eine Säuerung der Flüssigkeit nicht nachweisen läßt. Beim Sammeln und Auswaschen des Niederschlages auf dem Filter wird allerdings viel Phosphorsäure abgegeben und es braucht nicht zu verwundern, wenn Analysenzahlen gefunden wurden [Stockvis (l. c.)] die auf tertiäres Phosphat stimmen. Ich selbst habe bei der Untersuchung des in der Hitze aus Harn ausgefallenen Kalksalzes in dem günstigsten Falle, bei recht raschem und vorsichtigem Arbeiten, Zahlen gefunden, die auf ein Gemisch von 57 Proz. sekundärem und 43 Proz. tertiärem Kalkphosphat deuten.

Aus all dem Gesagten geht hervor, daß das Trübwerden beim Kochen nur bei solchen Harnen auftreten kann, welche sekundäres

Alkaliphosphat enthalten. Nun hat H. Dreser[1]) vor mehr als Jahresfrist die Behauptung aufgestellt, daß die Acidität des Harnes nicht einem wechselnden Mischungsverhältnis von primärem und sekundärem Phosphat zu danken sei, sondern daß sie allein vom primären Phosphat herrühre. Ja noch mehr, es soll im Harne noch freie Säure von höherer Säureintensität, als sie den primären Phosphaten zukommt, vorhanden sein, so daß man die Anwesenheit von freier Phosphorsäure im Harn annehmen muß. Dieser Ansicht ist, soweit mir bekannt ist, bis heute nicht widersprochen worden, und es ist daher notwendig, sich mit derselben zu befassen, um so mehr, als sie imstande wäre, alle unsere Ansichten von der biologischen Bedeutung der Nierenfunktion umzustoßen.

Wenn nämlich die Niere eine Säure von höherer Intensität absondert, als sie dem normalen Kohlensäuredrucke des Blutes entspricht, dann würde sie unter die Kategorien jener Drüsen einzureihen zu sein, welche, wie die Drüsen der Magenschleimhaut oder die Speicheldrüsen gewisser Schnecken, freie Säure abscheiden. Dann aber wäre nicht einzusehen, warum die Tätigkeit der Niere abhängig ist von der Säurekonzentration des Blutes und nicht von jener ihres Sekretes. Mit anderen Worten, die Funktion der Niere als Regulator der Säureverhältnisse im Blute wäre vollständig in Frage gestellt.

Dreser stützt seine Ansicht in erster Linie auf seine Beobachtung, daß die Gesamtacidität der untersuchten Harne auf primäres Phosphat umgerechnet, stets größer war, als die Menge von primärem Phosphat, die sich aus dem Gesamtphosphorsäuregehalte derselben Harne berechnete. Diese Behauptung Dresers darf aber nicht auf alle normalen Harne ausgedehnt werden. In sehr zahlreichen Versuchen — deren Aufführung im einzelnen wohl unnötig ist — konnte ich ausnahmslos konstatieren, daß in allen jenen Harnen, welche beim Kochen sich trübten, die aus der Gesamtacidität berechnete Menge von primärem Phosphat kleiner war, als die aus dem Gesamtphosphorsäuregehalt berechnete.

Daraus folgt mit Sicherheit, daß es eine große Menge von normalen Harnen gibt, in denen sicher neben dem primären auch sekundäres Phosphat vorhanden ist.

Nun gibt es aber auch viele Harne, die sich beim Kochen nicht trüben und bei solchen konnte ich die Befunde Dresers bestätigen; sie weisen beim Titrieren mit Lauge einen höheren

[1]) Diese Beiträge 6, 187.

Säuregehalt auf als der gesamten vorhandenen Phosphorsäure, wenn sie als primäres Phosphat gedacht ist, zukommt; die Frage aber, ob in diesen Harnen nur primäres Phosphat oder gar freie Phosphorsäure vorhanden sei, läßt sich mit den bisher üblichen und auch den von Dreser angewandten Hilfsmitteln nicht entscheiden.

Schon die Titration mit Phenolphtaleïn, für den Harn die beste Aciditätsbestimmung und vorderhand unentbehrlich, birgt zu viele Fehlerquellen. Wenn auch der Farbenumschlag nach einiger Übung und unter Benutzung der vorgeschriebenen Vergleichsprobe ziemlich scharf erkennbar ist, so sind doch ihre Resultate zu sehr von der Temperatur, der Menge des zugesetzten Indikators und ihres Verhältnisses zur Konzentration der titrierten Flüssigkeit usf. abhängig. Wenn man z. B. eine bis zum Farbenumschlag titrierte Harnprobe oder Phosphatlösung mit mehr Phenolphtaleïnlösung versetzt, so färbt sie sich sofort kräftig rot. Welches ist nun der richtige Wert?

Dazu kommen die Fehlerquellen, welche dem Harne besonders eigen sind. Da ist in erster Linie die altbekannte Wirkung der Kalksalze und der Bicarbonate. Dann kommen die Ammonsalze, deren Einfluß zwar von F. Moritz[1]) als ziemlich unbeträchtlich hingestellt wird und auch tatsächlich unbeträchtlich sein kann, unter Umständen aber sehr in die Wagschale fällt. In allen Fällen nämlich, in welchen die Möglichkeit geboten ist, daß aus dem Ammonsalz das NH_3 in Form eines komplexen Ions gebunden werden kann, wirken Ammonsalze wie freie Säuren. Darum rufen Ammonsalze im Organismus eine Art von Säurevergiftung hervor, Chlorammoniumlösungen lösen Magnesiummetall unter lebhafter Wasserstoffentwickelung und bei Gegenwart von Formaldehyd, und in geringerem Grade auch von Aceton, treiben sie Kohlensäure aus ihren Salzen aus; mit primärem Alkaliphosphat gemischt, färben sie Methylorange rötlich, und Harn, der sich beim Kochen trübt, tut das nicht mehr nach Zusatz von Chlorammonium, selbst Niederschläge von Kalkphosphaten lösen sich in warmen Chlorammoniumlösungen wieder auf.

Im Harn kommen in dieser Hinsicht wohl hauptsächlich die Magnesiumsalze in Betracht. Wenn man eine Lösung von Magnesium- und Ammoniumsalz mischt, mit Lackmus färbt und nun sekundäres

---

[1]) Über die Bestimmung der Bilanz von Säuren und Basen in tierischen Flüssigkeiten. Arch. f. klin. Med. 80, 409.

Natriumphosphat zusetzt, so tritt zuerst Blaufärbung ein; sowie aber Kristallbildung sich zeigt, wird die Flüssigkeit rot und man muß eine der Ammonsalzmenge entsprechende Menge von Lauge zufließen lassen, um wieder Blaufärbung zu erzielen.

$$MgSO_4 + Na_2HPO_4 = MgHPO_4 + Na_2SO_4$$
$$MgHPO_4 + NH_4Cl \rightleftarrows MgNH_4PO_4 + HCl.$$

F. Moritz (l. c.) hat gefunden, daß Magnesium neben Ammonsalzen im Harn die Titration nicht beeinflußt. Ich konnte seine Befunde häufig bestätigen, manchmal aber auch nicht; es scheint davon abzuhängen, ob Ammoniummagnesiumphosphat zur Abscheidung gelangt oder nicht. Wer aber die Harntitration nach der in manchen Büchern angegebenen Vorschrift ausübt, und so lange Lauge zugibt, bis die entstehende Rötung nach fünf Minuten nicht mehr verschwindet, der wird wohl stets falsch titrieren.

Die angeführten Fehlerquellen wirken alle nach einer Richtung — scheinbare Erhöhung der Harnacidität — aber sie sind doch mehr nebensächlich und man kann sich gegen sie teilweise schützen. Ein prinzipieller Fehler aber, wenn man es so nennen will, liegt in der Empfindlichkeit des Phenolphtaleïns, die dasselbe einerseits zur Titration der sauren Phosphate geeignet macht, andererseits aber dieselbe Titration im Harne aufs schwerste beeinflußt. Das Phenolphtaleïn ist nämlich eine so schwache Säure, daß es fast dem theoretisch sauren, in Wirklichkeit aber alkalischen sekundärem Phosphate entspricht. Im Harne finden sich aber eine Reihe von Substanzen, die teils direkt auf das Phenolphtaleïn, teils dadurch, daß sie das bei der Titration entstehende sekundäre Phosphat in primäres zurückverwandeln, als Säuren wirken. Und dazu gehören nicht nur kräftigere Säuren, wie Kohlensäure, Harnsäure oder die Körper der Oxyprotsäuregruppe usf., sondern selbst Körper, die gewöhnlich nicht als Säuren bezeichnet werden — Eiweißkörper, Albumosen, Peptone, Peptide, Formaldehyd, Aceton und andere. Eiweiß, das schon den verdünntesten Säuren (0,01 bis 0,02 normal) gegenüber sich wie eine Base verhält, nimmt bei Gegenwart nicht nur von stärkeren Basen, sondern auch von sekundärem Natriumphosphat elektronegative Ladung an; im Harn wirkt es also als Säure. Man kann sich z. B. leicht überzeugen, wie stark Zusatz von Witte Pepton, das doch auf Lackmus alkalisch wirkt, die Titration gegen Phenolphtaleïn zurückhält. Formaldehyd, der eine allerschwächste Säure mit der Dissoziationskonstante 1×10^{-14} darstellt (während die gewöhnlichen Indikatoren erst

mit Säuren der Dissoziationskonstante 1×10^{-5} reagieren), wirkt, dem Harn zugesetzt, bei der Titration so kräftig ein wie jede andere stärkere Säure.

Phenolphtaleïn ist also mit Recht längst als ein vorzügliches Mittel bekannt, um das Basenbindungsvermögen des Harnes zu bestimmen; die Phosphatacidität aber kann damit nicht bestimmt werden.

Ganz dasselbe gilt aber auch gegenüber den Versuchen Dresers, die Intensität der vorhandenen Säure dadurch zu bestimmen, daß die Menge von Salicyl- oder Anissäure gemessen wurde, welche ein bestimmtes Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit aus deren Salzen in Freiheit setzte und an ein bestimmtes Volumen Äther abgab. Die mit dieser Methode an reinen Phosphat- oder Säurelösungen gewonnenen Resultate dürfen nicht ohne weiteres auf den Harn übertragen werden. Wenn das primäre Phosphat mit salicylsaurem Natron Säure frei macht und diese vom Äther aufgenommen wird, so geht es ebenso in sekundäres Phosphat über, als wenn es mit Lauge neutralisiert würde. Die schwachen Säuren des Harnes verwandeln aber das gebildete sekundäre Phosphat in ein primäres zurück und täuschen so die Säureintensität des letzteren vor; die stärkeren Säuren des Harnes aber sind ihrerseits imstande, selbst recht beträchtliche Mengen von Salicylsäure in Freiheit zu setzen. Ich habe die einschlägigen Versuche nicht weiter verfolgt, nachdem ich mich überzeugt hatte, wie sehr der Zusatz indifferenter Substanzen, Chlorcalcium, Magnesium und Ammoniumsalz, Formaldehyd, die Ausbeute an Salicylsäure steigerten. Auch Zucker und Albumosen steigerten diese Ausbeute ein wenig, durch Aceton wurde sie merkwürdigerweise vermindert.

Das Ergebnis des Gesagten ist also, daß weder die genialen Versuche von Dreser noch die früherer Autoren den Nachweis erbringen, daß im Harne neben primären Phosphaten auch freie Phosphorsäure sich findet. Ja, wenn man bedenkt, daß auch der sauerste Harn Alizarinrot oder Methylorange nicht beeinflußt und erst nach Zusatz von mehr oder weniger Mineralsäure Farbenänderung eintritt, daß ferner tertiäres Calciumphosphat von solchen Harnen nicht angegriffen wird (so wenig wie von reinen primären Phosphatlösungen), und daß solche Harne beim Kochen mit Ammonsalzen freies Ammoniak abdunsten lassen, und zwar mehr als den mitdestilierenden organischen Säuren entspricht, so liegt immerhin die Vermutung nahe, daß auch in solchen Harnen, die sich beim

Kochen nicht trüben und mehr Gesamtsäure enthalten als dem vorhandenen Gesamtphosphat entspricht, noch kleine Mengen von sekundärem Phosphat vorhanden sind. Es herrscht eben im Harne ein labiles Gleichgewicht zwischen der verfügbaren Basenmenge, der Phosphorsäure und dem übrigen unentwirrbaren Gemische saurer organischer Körper, das sich ändert je nach dem Reagens, das auf den Harn einwirkt und über dessen Zustand vorläufig nichts ausgesagt werden kann.

Kürzere Mitteilungen.

6. Die Enzyme, namentlich das Chymosin, in ihrem Verhalten zu konzentriertem elektrischen Lichte.

Zweite (ergänzende) Mitteilung.

Von **Sigval Schmidt-Nielsen.**

Unter dem gleichen Titel habe ich in Band V dieser Beiträge eine Reihe von Untersuchungen über die Inaktivierung des Chymosins mit konzentriertem elektrischen Kohlenbogenlicht veröffentlicht. Als Hauptresultat meiner Untersuchungen konnte ich feststellen, daß sowohl das Chymosin selbst wie auch das Chymosinogen und das Antichymosin des Blutserums photolabil waren.

In bezug auf die quantitativen Verhältnisse der Inaktivierung habe ich in der vorigen Mitteilung gesagt, daß die Übereinstimmung zwischen unter gleichen Bedingungen ausgeführten Bestimmungen sehr unbefriedigend war. Durch die im Sommer 1904 im Finseninstitute fortgesetzten Untersuchungen bin ich auf eine Verwechselung aufmerksam geworden. Indem ich auf dieselbe aufmerksam mache, benutze ich die Gelegenheit, einige ergänzende Versuche, die ausgezeichnete Resultate zeigen, zur Besprechung heranzuziehen.

Wenn man die Tabellen I und II der vorigen Mitteilung (S. 363 und 364) betrachtet, ersieht man, daß die Koagulationszeiten, die nach einer bestimmten Belichtung, z. B. 10 Min., erhalten werden, trotz des Anfangs gleichen Wertes doch weit auseinandergehen. In einem Falle ist sie z. B. 10 mal so groß, als in einem anderen genau unter denselben Bedingungen ausgeführten Versuche. Wenn man, wie ich zuerst geneigt war, hieraus den Schluß zieht, daß die Wirkung oder, korrekter ausgedrückt, die Menge der in der Versuchskammer absorbierten chemisch wirksamen Strahlen auch 10 mal so groß gewesen sei, so ist das unberechtigt. Die Koagulationszeiten können nämlich nicht als ein direktes Maß für die erreichte Lichtwirkung angesehen werden; sie sind nur ein Hilfsmittel, um zu berechnen, wie viel Enzym noch unverändert ist, und dadurch, wie viel von der ursprünglichen (an und für sich unbekannten und unbestimmbaren) Menge durch das Licht inaktiviert worden ist. In den Tabellen I und II habe ich aus der ersten Mitteilung die Versuche mit 15 Min. Belichtung S. 363 und 364 zusammengestellt.

Tabelle I.

Koagulationszeit für 0,1 ccm Chymosinlösung und 10 ccm Ziegenmilch		Inaktiviertes Chymosin in Proz. der ursprünglichen Menge	Abweichung vom Durchschnitt = Δ
unbelichtete Probe	Probe belichtet in 15 Min.		
3 Min.	20 Min.	85,0	+ 8,3
2 „	58 „	96,6	+ 19,9
3 „	$9^1/_2$ „	68,4	÷ 8,3
$3^1/_2$ „	$9^1/_2$ „	63,2	÷ 13,5
$3^1/_2$ „	$11^1/_2$ „	69,6	÷ 7,1

Durchschnittlich 76,7 Proz. Inaktivierung.

Tabelle II.

Koagulationszeit für 0,1 ccm Chymosinlösung und 10 ccm Kuhmilch		Inaktiviertes Chymosin in Proz. der ursprünglichen Menge	Abweichung vom Durchschnitt = Δ
unbelichtete Probe	Probe belichtet in 15 Min.		
6 Min.	$16^1/_2$ Min.	63,6	÷ 11,4
$5^1/_4$ „	15 „	65,0	÷ 10,0
$7^1/_2$ „	50 „	85,0	+ 10,0
8 „	60 „	86,7	+ 11,7
$8^1/_2$ „	170 „	95,0	+ 20,0
8 „	31 „	74,2	÷ 0,8
8 „	24 „	66,7	÷ 8,3
8 „	$22^1/_4$ „	64,1	÷ 10,9

Durchschnittlich 75,0 Proz. Inaktivierung.

Man bekommt nun einen ganz anderen Eindruck von den erhaltenen Werten. Die Genauigkeit für eine Einzelbestimmung, nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet, ist allerdings, wenn man die beiden Serien zusammen berechnet, nicht besser als ± 16,33 Proz., was ja an sich wenig befriedigend ist, aber doch nicht so aussichtslos, wie es zuerst aussah.

Bei späteren Versuchen, wo ich die peinlichste Sorgfalt verwendet habe, alle Versuchsfehler zu eliminieren, habe ich nun die erreichte Genauigkeit in die Höhe getrieben. In einer Reihe von 22 Versuchen mit derselben Lampe habe ich bei 15 Min. Belichtung eine durchschnittliche Inaktivierung von 95,3 Proz. erreicht. Dabei betrug der berechnete mittlere Fehler für eine Einzelbestimmung ± 2,84 Proz. Eine zweite Serie, wo die Belichtung von einer der geschicktesten Assistentinnen der Klinik ausgeführt wurde, war die

Inaktivierung durchschnittlich 96,4 Proz. und der für eine Einzelbestimmung berechnete Mittelfehler ± 2,24 Proz.

Verschiedene Beobachtungen machten es während der Versuche allmählich wahrscheinlich, daß das destillierte Wasser, das in einer Menge von 1350 ccm in den unteren Teil des Apparates gefüllt wurde, einen ungünstigen Einfluß ausübte.

Dasselbe wird verwendet, um bei der klinischen Behandlung mit dem Finsenlichte einer lästigen Wärmewirkung zu entgehen. Indessen habe ich mich durch termoelektrische Messungen davon überzeugt, daß von den ultraroten Strahlen schon vom Wasser der Frontlinse so viel absorbiert wird, daß bei meiner Anordnung keine Wärmewirkung in Frage kommt (siehe meine Abhandlung: Einige Erfahrungen über die Verwendbarkeit des Lichtes als Reagens in Finsenmitteilungen Bd. X, 1906, Fischer, Jena, wo auch diese Versuche ausführlich besprochen sind).

Ich habe deswegen das Wasser des unteren Teiles des Finsenapparates entfernt. Dabei zeigte sich, daß bei Innehaltung genau derselben Versuchsanordnung wie früher die durchschnittliche Inaktivierung auf 99,1 Proz. anstieg (12 Versuche). Gleichzeitig blieb der für eine Einzelbestimmung berechnete Fehler ± 0,61 Proz., — eine Genauigkeit, die, wenn mit einem so ungünstigen Versuchsmaterial wie das Chymosin erreicht, wohl als ein Minimum angesehen werden darf.

Im Vergleiche mit diesem befriedigenden Resultate möchte ich daran erinnern, daß Forscher wie Duclaux (Ann. Inst. Pasteur, X, 1896) und Sebelien (Ges. d. Wiss., Christiania 1904) bei Belichtung von Oxalsäurelösungen mit Sonnenlicht gar keine Übereinstimmung fanden. Duclaux sagt, daß er bei gleichzeitigen Parallelbestimmungen nicht zu erklärende Differenzen bekam, und Sebelien fand z. B. gleichzeitig 11,7 und 44,1 Proz., 37,6 und 63,0 Proz. verbrannte Oxalsäure. Mit der Ederschen Flüssigkeit fand Sebelien eine Fehlerbreite von ± 6 Proz., aber gewöhnlich eine schlechtere Übereinstimmung, z. B. ± 27 Proz. — Gegenüber diesen Resultaten läßt mein Ergebnis mit ± 0,6 Proz. berechnetem mittlerem Fehler bei Belichtung von Chymosinlösungen weitere quantitative Versuche über die Inaktivierung von Enzymen und verwandten Körpern ganz vielversprechend erscheinen.

Berichtigungen.

Seite 324, Zeile 17 und 18 von oben lies: relatives **Steigen** der N-Ausscheidung (nicht Sinken).

" " Zeile 4 von unten lies: **zweitem** und **drittem** Kohlenstoffatom (nicht β- und γ-Kohlenstoffatom).

Verzeichnis der Mitarbeiter des achten Bandes.

